

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005年3月3日 (03.03.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/019450 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, C07K 14/47, C12N 5/08, A61K 35/26, A61P 35/00, 37/04

章 (SAGAWA,Hiroaki) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草津市 西渋川二丁目 6-3 2 Shiga (JP). 加藤 郁之進 (KATO,Ikunoshin) [JP/JP]; 〒529-1851 滋賀県 甲賀郡 信楽町長野 1 4 5 4 番地 1 5 Shiga (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/012238

(22) 国際出願日: 2004年8月19日 (19.08.2004)

(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA,Yoshinori); 〒540-6591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目7番3号 OMMビル5階 私書箱26号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(30) 優先権データ:

特願2003-298208	2003年8月22日 (22.08.2003)	JP
特願2004-000699	2004年1月5日 (05.01.2004)	JP
特願2004-115648	2004年4月9日 (09.04.2004)	JP
特願2004-222441	2004年7月29日 (29.07.2004)	JP

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒520-2193 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 出野 美津子 (IDENO,Mitsuko) [JP/JP]; 〒616-8176 京都府 京都市 右京区太秦乾町 28 番地 7 Kyoto (JP). 村木 信子 (MURAKI,Nobuko) [JP/JP]; 〒529-1851 滋賀県 甲賀郡 信楽町長野 520 Shiga (JP). 小川 衣子 (OGAWA,Kinuko) [JP/JP]; 〒520-2134 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 8-8-203 Shiga (JP). 岸本 真幸 (KISHIMOTO,Masayuki) [JP/JP]; 〒520-2133 滋賀県 大津市 野郷原一丁目 14-3-208 Shiga (JP). 榎 竜嗣 (ENOKI,Tatsuji) [JP/JP]; 〒610-0313 京都府 京田辺市 三山木野神 43 Kyoto (JP). 佐川 裕

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

A1

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING CYTOTOXIC LYMPHOCYTES

A1  
WO 2005/019450

(54) 発明の名称: 細胞傷害性リンパ球の製造方法

(57) Abstract: It is intended to provide a process for producing cytotoxic lymphocytes characterized by involving the step wherein, by using a medium having a total concentration of serum and plasma in the medium of from 0% by volume and less than 5% by volume, at least one treatment selected from among the induction of cytotoxic lymphocytes, maintenance thereof and upscaled culture thereof is carried out in the presence of fibronectin, its fragment or a mixture of the same.

(57) 要約: 本発明は、培地中における血清および血漿の総含有濃度が0容量%以上5容量%未満である培地を用いて、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養から選択される少なくとも1つを行う工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法を提供する。

## 明 細 書

## 細胞傷害性リンパ球の製造方法

## 技術分野

本発明は、医療分野において有用な、細胞傷害性リンパ球を取得する方法に関する。

## 背景技術

生体は主として免疫応答により異物から守られており、免疫システムはさまざまな細胞とそれが作り出す可溶性の因子によって成り立っている。なかでも中心的な役割を果たしているのが白血球、特にリンパ球である。このリンパ球はBリンパ球（以下、B細胞と記載することがある）とTリンパ球（以下、T細胞と記載することがある）という2種類の主要なタイプに分けられ、いずれも抗原を特異的に認識し、これに作用して生体を防御する。

T細胞は、CD (C l u s t e r o f D i f f e r e n t i a t i o n) 4マーカーを有し、主に抗体産生の補助や種々の免疫応答の誘導に関与するヘルパーT細胞（以下、T<sub>H</sub>と記載する）、CD8マーカーを有し、主に細胞傷害活性を示す細胞傷害性T細胞〔T<sub>c</sub>；細胞傷害性Tリンパ球（c y t o t o x i c T l y m p h o c y t e）、キラーT細胞とも呼ばれる。以下、C T Lと記載することがある〕に亜分類される。腫瘍細胞やウイルス感染細胞等を認識して破壊、除去するのに最も重要な役割を果たしているC T Lは、B細胞のように抗原に対して特異的に反応する抗体を産生するのではなく、標的細胞膜表面上に存在する主要組織適合複合体〔M H C：ヒトにおいてはヒト白血球抗原（H L A）と称することもある〕クラスI分子に会合した標的細胞由来の抗原（抗原ペプチド）を直接認識して作用する。この時、C T L膜表面のT細胞レセプター（以下、

TCRと称す)が前述した抗原ペプチドおよびMHCクラスI分子を特異的に認識して、抗原ペプチドが自己由来のものなのか、あるいは、非自己由来のもののかを判断する。そして、非自己由来と判断された標的細胞はCTLによって特異的に破壊、除去される。

近年、薬剤治療法や放射線治療法のように患者に重い肉体的負担がある治療法が見直され、患者の肉体的負担が軽い免疫治療法への関心が高まっている。特に免疫機能が正常なヒト由来のリンパ球から目的とする抗原に対して特異的に反応するCTLを生体外(ex vivo)で誘導した後、もしくは誘導を行わず、リンパ球を拡大培養し、患者へ移入する養子免疫療法の有効性が注目されている。例えば、動物モデルにおいて養子免疫療法がウイルス感染および腫瘍に対して有効な治療法であることが示唆されている(例えば、Greenberg, P. D. 著, 1992年発行, Advances in Immunology 及び Reusser P. 他3名, Blood, 1991年, Vol. 78, No. 5, P1373~1380)。この治療法ではCTLの抗原特異的傷害活性を維持もしくは増強させた状態でその細胞数を維持あるいは増加させることが重要である。

上記のような養子免疫療法において、治療効果を得るために一定量以上の細胞数の細胞傷害性リンパ球を投与する必要がある。すなわち、ex vivoでこれらの細胞数を短時間に得ることが最大の問題であるといえる。

CTLの抗原特異的傷害活性を維持および増強するためには、CTLについて抗原に特異的な応答を誘導する際に、目的とする抗原を用いた刺激を繰り返す方法が一般的である。しかし、通常、この方法では最終的に得られるCTL数が減少し、十分な細胞数が得られない。

疾病の治療に有効なT細胞を調製する方法としては、例えば、リンフォカイン活性化キラー細胞(LAK細胞)を用いる養子免疫療法(例えば、Rosenberg S. A. 他, N. Engl. J. Med. 1987年, Vol

316, No. 15, P 889~897)、高濃度のインターロイキン-2 (IL-2) を用いて誘導した腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を用いる養子免疫療法 (例えば、Rosenberg S. A. 他, N. Engl. J. Med. 1988年, Vol. 319, No. 25, P 1676~1680 およびHo M. 他9名, Blood, 1993年, Vol. 81, No. 8, P 2093~2101) が知られている。

次に、抗原特的なCTLの調製に関しては、自己CMV感染線維芽細胞とIL-2 (例えば、Riddell S. A. 他4名, J. Immunol., 1991年, Vol. 146, No. 8, P 2795~2804)、あるいは抗CD3モノクローナル抗体 (抗CD3 mAb) とIL-2を用いて、それぞれCMV特的CTLクローニングを単離ならびに大量培養する方法 (例えば、Greenberg P. D. 他1名, J. Immunol. Methods, 1990年, Vol. 128, No. 2, P 189~201) が報告されている。

さらに、国際公開第96/06929号パンフレットにはREM法 (rapid expansion method) が開示されている。このREM法は、抗原特的CTLおよびT<sub>H</sub>を含むT細胞の初期集団を短期間で増殖 (expand) させる方法である。つまり、個々のT細胞クローニングを増殖させて大量のT細胞を提供可能であり、抗CD3抗体、IL-2、並びに放射線照射により増殖性をなくしたPBMC (peripheral blood mononuclear cell、末梢血単核細胞) とエプスタイン-バールウイルス (Epstein-Barr virus、以下EBVと略す) 感染細胞とを用いて抗原特的CTL数を増加させることが特徴である。

また、国際公開第97/32970号パンフレットには改変REM法が開示されており、当該方法はPBMCとは区別されるT細胞刺激成分を発現する分裂していない哺乳動物細胞株をフィーダ細胞として使用し、PBMCの使用量を低減

させる方法である。

リンフォカイン活性化キラー細胞（LAK細胞）は、リンパ球を含む末梢血液（末梢血白血球）や臍帯血、組織液等にIL-2を加えて、数日間試験管内で培養することにより得られる細胞傷害活性を持つ機能的細胞集団である。この際、抗CD3抗体を加えて培養することにより、さらにLAK細胞の増殖は加速する。このようにして得られたLAK細胞は非特異的にさまざまがん細胞やその他のターゲットに対して傷害活性を有する。LAK細胞も上記CTLと同様に、養子免疫療法に使用される。

上記のとおり、細胞傷害性リンパ球、例えばCTL、LAK細胞、TIL等を取得する工程においてはIL-2の利用を欠かすことができない。IL-2が細胞表面のインターロイキン-2レセプター（IL-2R）に結合することにより細胞はさらに活性化される。また、IL-2Rはリンパ球の活性化マーカーとして知られている。これらの点において、細胞表面のIL-2Rの発現を上昇させることは重要である。また、CTLの誘導においては、抗原による刺激に供されたCTLの前駆細胞がCTLとして誘導される効率を向上させること、すなわち、誘導後の細胞群におけるCD8陽性細胞の割合（比率）を向上させることが重要である。

またこれらリンパ球を体外において拡大培養する際には通常血清または血漿が5容量%から20容量%添加される。この血清・血漿はリンパ球等の細胞をex vivoで培養する際に必要とされる成分であるが、血清・血漿は非自己動物（ヒト・ウシ等）の血液をその由来とするため各種ウイルス感染等の危険性が排除できない。また、現在の検出技術では検出することが出来ないようなウイルス・病原性微生物の存在を完全否定することは不可能である。

この観点から、近年、患者由来の血清・血漿（自己血清・血漿）の使用が進められている。しかし、培養に必要な量の血清・血漿を確保するために患者自身の血液を多量に採取することは、患者への肉体的負担が大きく、生命の危険につな

がる可能性もある。この危険を回避するため、少量の血清・血漿を用いて、治療に必要なリンパ球を得る拡大培養を行うと必然的に低濃度血清・血漿での培養となる。一般にリンパ球等の細胞は低血清・低血漿条件における培養では増殖が不安定となり治療に必要な量の細胞が得られない。さらに、上述の肉体的負担および感染の危険性を回避するためには無血清培養が強く求められるが、このような培養条件ではほとんどの細胞が増殖しなくなる。

このため、低血清・無血清（低血漿・無血漿）でのリンパ球拡大培養方法が強く求められている。

無血清（無血漿）条件下でのリンパ球拡大培養方法が確立されれば、血清・血漿のロット間の差を排除でき、患者血清・血漿に由来する負要因（免疫抑制成分等）を排除することが出来ることから、この系の確立によって得られる利益は計り知れない。

フィブロネクチンは動物の血液中、培養細胞表面、組織の細胞外マトリックスに存在する分子量25万の巨大な糖タンパク質であり、多彩な機能を持つことが知られている。そのドメイン構造は7つに分けられており（以下、第1図参照）、またそのアミノ酸配列中には3種類の類似の配列が含まれており、これら各配列の繰返しで全体が構成されている。3種類の類似の配列はI型、II型、III型と呼ばれ、このうち、III型はアミノ酸残基71～96個のアミノ酸残基で構成されており、これらのアミノ酸残基の一致率は17～40%である。フィブロネクチン中には14のIII型の配列が存在するが、そのうち、8番目、9番目、10番目（以下、それぞれIII-8、III-9、III-10と称する。）は細胞結合ドメインに、また12番目、13番目、14番目（以下、それぞれIII-12、III-13、III-14と称する。）はヘパリン結合ドメインに含有されている。また、III-10にはVLA (very late activation antigen)-5結合領域が含まれており、このコア配列はRGDSである。また、ヘパリン結合ドメインのC末端側にはIII

CSと呼ばれる領域が存在する。I I I C Sには25アミノ酸からなるV L A-4に対して結合活性を有するCS-1と呼ばれる領域が存在する（例えば、Deane F. Momer著、1988年発行、FIBRONECTIN, ACADEMIC PRESS INC., P1~8、Kimizuka F.他8名、J. Biochem., 1991年、Vol. 110, No. 2, p 284-291およびHanenbergs H. 他5名、Human Gene Therapy, 1997年、Vol. 8, No. 18, p 2193-2206）。

### 発明の開示

本発明の目的は、安全性が高く、医療への使用に適した、細胞傷害活性を高いレベルで保持した細胞傷害性リンパ球を取得する方法を提供することにある。

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、培地中における血清および血漿の総含有濃度が0容量%以上5容量%未満である培地を用いて、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養から選択される少なくとも1つを行う工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法に関する。本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に製造されたものと比較して、インターロイキン-2レセプターを高発現する細胞傷害性リンパ球が例示される。また、本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に製造されたものと比較して、CD8陽性細胞を高比率で含有する細胞傷害性リンパ球が例示される。また、本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下での細胞傷害性リンパ球の製造方法により製造されたものと比較して、拡大培養率が高い細胞傷害性リンパ球

が例示される。また、本発明の第1の発明で製造される細胞傷害性リンパ球としては、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に製造されたものと比較して、細胞傷害活性が増強されたもしくは高い細胞傷害活性が維持された細胞傷害性リンパ球が例示される。

本発明の第1の発明において、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の使用については、これらが固相に固定化されて使用されることが例示される。ここで固相としては細胞培養用器材または細胞培養用担体が例示される。細胞培養用器材としては、シャーレ、フラスコまたはバッグが例示され、細胞培養用担体としては、ビーズ、メンブレンまたはスライドガラスが例示される。

本発明の第1の発明において、細胞傷害性リンパ球としては、リンフォカイン活性化キラー細胞が例示される。

本発明の第1の発明において、フィブロネクチンのフラグメントとしては、配列表の配列番号1～8で表されるいずれかのアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチド(m)であるか、または前記いずれかのアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであって、前記ポリペプチド(m)と同等な機能を有するポリペプチド(n)が例示される。フィブロネクチンのフラグメントとしては、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものが例示される。また、フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号9～20および25で表されるいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチドが例示される。

本発明の第1の発明において、当該製造方法を細胞培養用器材中で行う場合の一態様として、

(a) 培養開始時の細胞数と細胞培養用器材における培養面積との比率が、 $1 \text{ c e l l} / \text{cm}^2 \sim 5 \times 10^5 \text{ c e l l s} / \text{cm}^2$ である、および／または

(b) 培養開始時の培地中の細胞の濃度が、 $1\text{ c e l l}/\text{mL} \sim 5 \times 10^5 \text{ c e l l s}/\text{mL}$ である、

の条件を満たすことが例示される。

また、このような製造方法としては、細胞培養液を希釈する工程を要しない方法が例示される。

本発明の第1の発明において、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なくともいずれか1つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で行なう場合、例えば、少なくとも1回の、細胞培養液の希釈工程、培地の交換工程もしくは細胞培養用器材の交換工程を包含し、かつ少なくとも1回の、細胞培養液の希釈工程直後、培地の交換工程直後もしくは細胞培養用器材の交換工程直後の培養条件が、

(c) 細胞培養液中の細胞の濃度が $2 \times 10^5 \text{ c e l l s}/\text{mL} \sim 1 \times 10^8 \text{ c e l l s}/\text{mL}$ である、もしくは

(d) 細胞培養液中の細胞数と細胞培養用器材における培養面積との比率が $1 \times 10^5 \text{ c e l l s}/\text{cm}^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ c e l l s}/\text{cm}^2$ である、

の条件を満たすことが例示される。

本発明の第1の発明の製造方法において、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なくともいずれか1つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で行なう場合、特に限定はないが、例えば、少なくとも1回の、細胞培養液の希釈工程、培地の交換工程もしくは細胞培養用器材の交換工程を包含し、かつ少なくとも1回の、細胞培養液の希釈工程直後、培地の交換工程直後もしくは細胞培養用器材の交換工程直後の培地中における血清および血漿の総含有濃度が培養開始時と同じか、もしくは培養開始時よりも低減されていることが例示される。

本発明の第1の発明において、細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む方法が例示される。ここで外来遺伝子の導入としては、レトロウ

イルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスを用いて導入することが例示される。

本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球に関する。

本発明の第3の発明は本発明の第1の発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球を有効成分として含有する医薬に関する。

本発明の第4の発明は、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有し、かつ血清および血漿の総含有濃度が0容量%以上5容量%未満であることを特徴とする細胞傷害性リンパ球培養用培地に関する。

本発明により、安全性が高く、患者への負担が軽減された細胞傷害性リンパ球の製造方法が提供される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、フィブロネクチンのドメイン構造を示す模式図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明は、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持又は拡大培養方法において、フィブロネクチン及び／又はフィブロネクチンフラグメントの存在下に細胞傷害性リンパ球を調製することにより、培地中の血清や血漿の含有量を低減または除去しても、高い拡大培養率で充分な細胞傷害活性を有し、IL-2Rの発現量が高く、さらにCD8陽性細胞の比率が高い細胞傷害性リンパ球が得られることを見出し、完成するに至ったものである。

なお、本明細書において細胞傷害性リンパ球の製造とは、当該細胞の誘導（活性化）、維持、拡大培養の各工程、もしくはこれらを組み合わせた工程を包含する操作を指す。また、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造を、細胞傷害性リンパ

球の培養とも称する。

以下、本発明を具体的に説明する。

(1) 本発明に使用されるフィブロネクチン、およびそのフラグメント

本明細書中に記載のフィブロネクチンおよびそのフラグメントは、天然から得られたもの、または人為的に合成されたもののいずれでもよい。フィブロネクチンおよびそのフラグメントは、例えば、ルオスラーティ E. ら [R u o s l a h t i E. , et al. , ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. B i o l. C hem. )、第 256 卷、第 14 号、第 7277~7281 頁 (1981) ] の開示に基づき、天然起源の物質から実質的に純粋な形態で製造することができる。ここで、本明細書に記載された実質的に純粋なフィブロネクチンまたはフィブロネクチンフラグメントとは、これらが天然においてフィブロネクチンと一緒に存在する他のタンパク質を本質的に含有していないことを意味する。上記のフィブロネクチンおよびそのフラグメントは、それぞれ単独で、もしくは複数の種類のものを混合して本発明に使用することができる。

なお、フィブロネクチンは多くのスプライシングバリエントの存在が知られているが、本発明に使用されるフィブロネクチンとしては、本発明の所望の効果を発現するものであれば、いずれのバリエントも使用することができる。例えば、血漿由来のフィブロネクチンの場合、細胞結合ドメインの上流に存在する E D - B と呼ばれる領域、細胞結合ドメインとヘパリン結合ドメインの間に存在する E D - A と呼ばれる領域が欠失していることが知られているが、このような血漿由来のフィブロネクチンも本発明に使用することができる。

本発明に使用できるフィブロネクチンフラグメント、ならびに該フラグメントの調製に関する有用な情報は、キミヅカ F. ら [K i m i d u k a F. , et al. , ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. B i o c h e m. )、第 110 卷、第 284~291 頁 (1991) ]、コーンブリット A. R. ら [K o r n b r i h t t A. R. , et al. , EMBO ジャ

ーナル (EMBO J.) 、第4巻、第7号、1755～1759 (1985) ] 、およびセキグチ K. ら [Sekiguchi K. , et al. 、バイオケミストリー (Biochemistry) 、第25巻、第17号、4936～4941 (1986) ] 等より得ることができる。また、フィブロネクチンのアミノ酸配列については、Genbank Accession No. NM\_002026 (NP\_002017) に開示されている。

本発明において、フィブロネクチンフラグメントとしては、例えば、III-8 (配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列) 、III-9 (配列表の配列番号2で表されるアミノ酸配列) 、III-10 (配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列) 、III-11 (配列表の配列番号4で表されるアミノ酸配列) 、III-12 (配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列) 、III-13 (配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列) 、III-14 (配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列) 、およびCS-1 (配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列) のいずれかの領域を構成するアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチド (m) (第1図参照) や、前記いずれかのアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列を少なくとも1つ含んでなるポリペプチドであって、前記ポリペプチド (m) と同等な機能を有するポリペプチド (n) が例示される。

また、当該フラグメントとしては、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものが好適に使用できる。細胞接着活性は、本発明で使用されるフラグメント (その細胞結合ドメイン) と細胞との結合を公知の方法を使用してアッセイすることにより調べることができる。例えば、このような方法には、ウイリアムズ D. A. らの方法 [Williams D. A. , et al. 、ネイチャー (Nature) 、第352巻、第438～441頁 (1991) ] が含まれる。当該方法は、培養プレートに固定化したフラグメントに対する細胞の結合を測定する方法である。また、ヘパリン結合活性は、本発明に使用され

るフラグメント（そのヘパリン結合ドメイン）とヘパリンとの結合を公知の方法を使用してアッセイすることにより調べることができる。例えば、上記のウイリアムズ D. A. らの方法において、細胞に換えてヘパリン、例えば標識ヘパリンを使用することにより、同様の方法でフラグメントとヘパリンとの結合の評価を行うことができる。

さらにフィブロネクチンのフラグメントとしては、C-274（配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列）、H-271（配列表の配列番号10で表されるアミノ酸配列）、H-296（配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列）、CH-271（配列表の配列番号12で表されるアミノ酸配列）、CH-296（配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列）、C-CS1（配列表の配列番号14で表されるアミノ酸配列）、またはCH-296Na（配列表の配列番号25で表されるアミノ酸配列）より選択されるポリペプチドが例示される。なお、CH-296Naについては本願において初めて作製されたポリペプチドである。

上記のCH-271、CH-296、CH-296Na、C-274、C-CS1の各フラグメントはVLA-5に結合する活性を有する細胞結合ドメインを有するポリペプチドである。また、C-CS1、H-296、CH-296、CH-296NaはVLA-4に結合する活性を有するCS-1を有するポリペプチドである。さらに、H-271、H-296、CH-271、CH-296およびCH-296Naはヘパリン結合ドメインを有するポリペプチドである。なお、CH-296Naは血漿由来のフィブロネクチンにおける細胞結合ドメインからCS-1までを含むポリペプチドである。すなわち、CH-296NaはGenbank Accession No. NM\_002026 (NP\_002017) に開示されているフィブロネクチンのアミノ酸配列の1270番目のプロリンから2016番目のスレオニンまでを含むポリペプチドより、1631番目のアスパラギンから1720番目のスレオニンにわたる領域 (ED-A) が

欠失したポリペプチドである。

本発明においては、上記の各ドメインが改変されたフラグメントも使用することができる。フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインは3つのIII型配列（III-12、III-13、III-14）によって構成されている。前記III型配列のうちの一つもしくは二つを欠失したヘパリン結合ドメインを含むフラグメントも本発明に使用することが可能である。例えば、フィブロネクチンの細胞結合部位（VLA-5結合領域、Pro1239~Ser1515）と一つのIII型配列とが結合したフラグメントであるCHV-89（配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列）、CHV-90（配列表の配列番号16で表されるアミノ酸配列）、CHV-92（配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列）、あるいは二つのIII型配列とが結合したフラグメントであるCHV-179（配列表の配列番号18で表されるアミノ酸配列）、CHV-181（配列表の配列番号19で表されるアミノ酸配列）が例示される。CHV-89、CHV-90、CHV-92はそれぞれIII-13、III-14、III-12を含むものであり、CHV-179はIII-13とIII-14を、CHV-181はIII-12とIII-13をそれぞれ含んでいる。

また、上記の各フラグメントにさらにアミノ酸を付加したフラグメントも本発明に使用することができる。当該フラグメントは、例えば、後述の製造例に記載のH-275-Cysの製造方法に準じて上記各フラグメントに所望のアミノ酸を付加することにより製造可能である。例えば、H-275-Cys（配列表の配列番号20で表されるアミノ酸配列）は、フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインを有し、かつC末端にシステイン残基を有するフラグメントである。

なお、本発明に使用されるフラグメントとしては、本発明の所望の効果が得られる限り、上記に例示した天然のフィブロネクチンのアミノ酸配列の少なくとも一部を含むフラグメントと同等な機能を有する、当該フラグメントを構成するポリペプチドのアミノ酸配列に1もしくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入も

しくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドからなるものであってもよい。

アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチドの機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチドの物理化学的性状等を変化させ得る程度のものであるのが好ましい。例えば、アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチドの持つ性質（例えば、疎水性、親水性、電荷、pK等）を実質的に変化させない範囲の保存的なものが好ましい。例えば、アミノ酸の置換は、1. グリシン、アラニン；2. バリン、イソロイシン、ロイシン；3. アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；4. セリン、スレオニン；5. リジン、アルギニン；6. フェニルアラニン、チロシンの各グループ内の置換であり、アミノ酸の欠失、付加、挿入は、ポリペプチドにおけるそれらの対象部位周辺の性質に類似した性質を有するアミノ酸の、対象部位周辺の性質を実質的に変化させない範囲での欠失、付加、挿入が好ましい。

アミノ酸の置換等は種間や個体差に起因して天然に生ずるものであってもよく、また、人工的に誘発されたものであってもよい。人工的な誘発は公知の方法により行えばよく、特に限定はないが、例えば、公知の手法により、天然のフィプロネクチン由来の前記領域や所定のフラグメントをコードする核酸において1もしくは複数個の塩基が置換、欠失、付加もしくは挿入された所定の核酸を作製し、それを使用して、天然のフィプロネクチン由来の前記領域や所定のフラグメントと同等な機能を有する、当該フラグメント等を構成するポリペプチドのアミノ酸配列に置換等を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを製造することができる。

また、本明細書において「同等な機能を有する」とは、比較対照であるポリペプチドが、天然由来のフィプロネクチンフラグメントの有する、(i) 細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性の増強又は維持機能、(ii) IL-2Rの発現量の増強機能、(iii) CD8陽性細胞の比率向上機能、または(iv) 細胞傷害

性リンパ球の拡大培養率の向上機能の少なくともいずれかの機能を有することをいう。前記機能は後述の実施例に記載の方法に準じて適宜確認することができる。また、アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントとしては、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものが好適である。細胞接着活性およびヘパリン結合活性は、それらの前記活性測定方法に準じて評価することができる。

アミノ酸の置換等を有するポリペプチドからなるフラグメントとして、例えば、2つの異なるドメイン間にリンカーとして1以上のアミノ酸が挿入されたフラグメントも本発明に使用することができる。

なお、フィブロネクチンについても、上記のフラグメントと同様、そのポリペプチドのアミノ酸配列に1もしくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、少なくとも前記(i)～(iv)のいずれかの機能を有するポリペプチドを、本発明において使用することができる。

本明細書中に記載のフィブロネクチンフラグメントは、例えば、米国特許第5,198,423号明細書の記載に基づいて遺伝子組換え体より製造することができる。例えば、上記のH-271(配列番号10)、H-296(配列番号11)、CH-271(配列番号12)、CH-296(配列番号13)の各フラグメントならびにこれらを取得する方法は当該特許明細書に詳細に記載されている。また、CH-296Na(配列番号25)とその製造方法については後述の(3)CH-296Naについて、および実施例に記載されている。また、上記のC-274(配列番号9)フラグメントは米国特許第5,102,988号明細書に記載された方法により得ることができる。さらに、C-CS1(配列番号14)フラグメントは日本特許第3104178号明細書に記載された方法により得ることができる。上記CHV-89(配列番号15)、CHV-90(配列番号16)、CHV-179(配列番号18)の各フラグメントは、日本特許第

2729712号明細書に記載された方法により得ることができる。また、CHV-181（配列番号19）フラグメントは国際公開第97/18318号パンフレットに記載された方法に準じて得ることができる。CHV-92（配列番号17）フラグメントは、日本特許第2729712号明細書および国際公開第97/18318号パンフレットを参照し、それらの文献に記載されたプラスミドに基づいて定型的にプラスミドを構築し、該プラスミドを用いて遺伝子工学的に取得することができる。

これらのフラグメントまたはこれらフラグメントから定型的に誘導できるフラグメントは、〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに下記受託番号のもとで寄託された微生物を用いて製造する、あるいは各微生物の保持するプラスミドを公知の方法により改変することにより製造することができる；

FERM BP-2264（H-271をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1989年1月30日）、

FERM BP-2800（CH-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1989年5月12日）、

FERM BP-2799（CH-271をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1989年5月12日）、

FERM BP-7420（H-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1989年5月12日）、

FERM BP-1915（C-274をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1988年6月17日）、

FERM BP-5723（C-CS1をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1990年3月5日）、

FERM BP-10073（CH-296Naをコードするプラスミド；寄託日 2004年7月23日）

F E R M P - 1 2 1 8 2 ( C H V - 8 9 をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1991年4月8日)、

F E R M P - 1 2 1 8 3 ( C H V - 1 7 9 をコードするプラスミドを保有する大腸菌；寄託日 1991年4月8日)。

フィブロネクチンは巨大な糖タンパク質であるため、天然起源のタンパク質を調製して使用することは産業上および医薬品製造上、必ずしも容易ではない。また、フィブロネクチンは多機能タンパク質であることから、その使用の状況によっては、本発明の方法に効果を示す領域とは異なる領域に起因する不都合が起こることも考えられる。これらのことから、本発明においては、入手、取り扱いの容易さ、安全面の観点から、好適にはフィブロネクチンフラグメント、さらに好適には前記のようにして得られる組換えフィブロネクチンフラグメントを使用することができる。さらに、後述するリンパ球の拡大培養率の向上、拡大培養されたリンパ球における I L - 2 R の発現量の上昇、および拡大培養されたリンパ球集団中の C D 8 陽性細胞の比率の向上、細胞傷害活性の上昇等の効果を示すことができるフィブロネクチンフラグメントが特に好適に使用できる。また、本発明に使用されるフィブロネクチンフラグメントの分子量としては、特に限定はないが、好適には 1 ~ 2 0 0 k D、より好適には 5 ~ 1 9 0 k D、さらに好適には 1 0 ~ 1 8 0 k D である。当該分子量は、例えば、 S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定することができる。

なお、本発明のフィブロネクチンフラグメントを構成するポリペプチドのアミノ酸配列において、天然由来のフィブロネクチンフラグメントを構成するポリペプチドのアミノ酸配列以外のアミノ酸配列部分は、本発明の所望の効果の発現を阻害しない限り任意であり、特に限定されるものではない。

## (2) 本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法

以下、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法について具体的に説明する。本

発明の方法は、培地中における血清及び血漿の総含有濃度が0容量%以上5容量%未満である培地を用いて、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいはずれか1つを行なう細胞傷害性リンパ球の製造方法である。

本明細書において細胞傷害性リンパ球とは細胞傷害性リンパ球を含有する細胞群を意味する。なお、狭義には前記細胞群に含有されている細胞傷害性リンパ球のみを示すことがある。また、本発明において細胞傷害性リンパ球の製造とは、本発明の細胞傷害性リンパ球になり得る前駆細胞からの細胞傷害活性を有するリンパ球への誘導、細胞傷害性リンパ球の維持、細胞傷害性リンパ球および／または前駆細胞を用いた細胞傷害性リンパ球の拡大培養のいずれをも包含するものである。本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法においては、該方法に供する細胞の種類や、培養の条件等を適宜調整することにより、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持または拡大培養が行なわれることになる。

本発明の細胞傷害性リンパ球としては、特に限定するものではないが、例えば細胞傷害活性を有する、リンフォカイン活性化キラー細胞（LAK細胞）、細胞傷害性T細胞（CTL）、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、NK細胞等が挙げられる。

本発明において、細胞傷害性リンパ球になり得る、すなわち、該リンパ球への分化能を有する前駆細胞としては、末梢血単核球（PBMC）、NK細胞、ナイーブ細胞、メモリー細胞、造血幹細胞、臍帯血単核球等が例示される。また、血球系細胞であれば本発明において前駆細胞として使用できる。これらの細胞は生体から採取されたものをそのままもしくは凍結保存したもののいずれも使用することができる。なお、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法では、前記細胞を含有する材料、例えば、末梢血液、臍帯血等の血液や、血液から赤血球や血漿等の成分を除去したもの、骨髓液等を使用することができる。

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法は、フィブロネクチン、そのフラグメ

ントまたはそれらの混合物から選択される有効成分の存在下に細胞傷害性リンパ球を製造することを1つの大きな特徴とする。なお、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法は、細胞傷害性リンパ球の培養の全期間、もしくは任意の一部の期間において行われる。すなわち、細胞傷害性リンパ球の製造工程の一部に前記工程を含むものであれば本発明に包含される。

さらに、従来の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法では、培地中に5～20容量%の血清・血漿の添加が必要であったのに対し、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法は、これら血清および血漿の培地中の総含有濃度を0容量%以上5容量%未満とすることを特徴とする。血清および血漿の培地中の総含有濃度は、好適には0容量%以上4容量%以下、特に好適には0容量%以上3容量%以下とすることができる。本発明の特に好適な態様においては、培地中に血清・血漿を全く添加することなく、十分な細胞傷害性リンパ球の製造を行うことができ、安全面や患者への負担を軽減させる点で非常に有用な方法である。また、本発明において、使用する血清・血漿の使用量をさらに低減させたい場合は、培養途中において血清・血漿の使用量を段階的に低減させることができる。すなわち、培養開始時の血清・血漿濃度に対して、後述する細胞培養液の希釀、培地交換もしくは細胞培養用器材の交換の際に使用される新たな培地中の血清・血漿濃度を低減させるもしくは添加しないことで、血清・血漿の使用量を通常より低減させることができる。よって、本発明によれば、少なくとも1回の、細胞培養液の希釀工程、培地の交換工程もしくは細胞培養用器材の交換工程を包含し、かつ少なくとも1回の、細胞培養液の希釀工程直後、培地の交換工程直後もしくは細胞培養用器材の交換工程直後の培地中における血清および血漿の総含有濃度が培養開始時と同じか、もしくは培養開始時よりも低減されている細胞傷害性リンパ球の製造方法が提供される。

なお、血清又は血漿の由来としては、自己（使用する細胞傷害性リンパ球の前駆細胞と由来が同じであることを意味する）もしくは非自己（使用する細胞傷害

性リンパ球の前駆細胞と由来が異なることを意味する) のいずれでも良いが、好適には安全性の観点から自己由来のものが使用できる。

本発明の方法において、細胞傷害性リンパ球の製造、すなわち、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および／または拡大培養は、通常、本発明の前記有効成分の存在下に、所定の成分を含む培地中で行なわれる。

例えば、本発明の方法において、細胞傷害性リンパ球の誘導もしくは拡大培養を意図する場合、本発明において使用される培養開始時の細胞（細胞傷害性リンパ球および／または前駆細胞）数としては、特に限定はないが、例えば $1 \text{ c e } 1$  $1 / \text{mL} \sim 1 \times 10^8 \text{ c e } 11 \text{ s } / \text{mL}$ 、好適には $1 \text{ c e } 11 / \text{mL} \sim 5 \times 10^7 \text{ c e } 11 \text{ s } / \text{mL}$ 、さらに好適には $1 \text{ c e } 11 / \text{mL} \sim 2 \times 10^7 \text{ c e } 11 \text{ s } / \text{mL}$ が例示される。また、培養条件に特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができる。例えば、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で細胞培養液を新鮮な培地を加えて希釀するか、培地を交換するか、もしくは細胞培養用器材を交換することができる。

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法において使用される培地には血清および血漿の総含有濃度を除いては特に限定はなく、細胞傷害性リンパ球、その前駆細胞の維持、生育に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、たとえば市販の培地を適宜選択して使用することができる。これらの培地はその本来の構成成分以外に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の成分を含んでいてもよい。好適には、IL-2を含有する培地が本発明に使用される。IL-2の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば、好適には $0.01 \sim 1 \times 10^5 \text{ U/mL}$ 、より好適には $0.1 \sim 1 \times 10^4 \text{ U/mL}$ である。

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法において使用される細胞培養用器材としては、特に限定はないが、例えば、シャーレ、フラスコ、バッグ、大型培養槽

、バイオリアクター等を使用することができる。なお、バッグとしては、下記実施例34～38および45～52に記載のとおり、細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを使用することができる。また、工業的に大量のリンパ球を製造する場合には、大型培養槽を使用することができる。また、培養は開放系、閉鎖系のいずれのものも使用することができるが、好適には得られるリンパ球の安全性の観点から閉鎖系で培養を行うことが好ましい。

また、抗CD3抗体をさらに含有する培地中で細胞傷害性リンパ球になり得る前駆細胞を培養することもできる。抗CD3抗体の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば0.001～100μg/mL、特に0.01～100μg/mLが好適である。抗CD3抗体はリンパ球上のレセプターを活性化する目的で添加することができる。また、この他、レクチン等のリンパ球刺激因子を添加することもできる。当該成分の培地中の濃度は、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

なお、本発明の有効成分を含め、上記成分は培地中に溶解して共存させる他、適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグ等の細胞培養用器材（開放系のもの、および閉鎖系のもののいずれをも含む）、またはビーズ、メンブレン、スライドガラス等の細胞培養用担体に固定化して使用してもよい。なお、ビーズへの固定化としては、下記実施例61および62に記載のとおりに行うことができる、製造されたビーズは下記実施例63および64に記載のとおりに使用することができる。それらの固相の材質は細胞培養に使用可能なものであれば特に限定されるものではない。該成分を、例えば、前記器材に固定化する場合、培地を該器材に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、当該成分の固定化量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。前記担体は、細胞培養時に細胞培養用器材中の培養液に浸漬して使用される。前記成分を前記担体に固定化する場合、該担体を培地に入れた際に、

該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、当該成分の固定化量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

例えば、フィブロネクチンのフラグメントの固定化は、国際公開第97/18318号パンフレット、ならびに国際公開第00/09168号パンフレットに記載の方法により実施することができる。

前記の種々の成分や、本発明の有効成分を固相に固定化しておけば、本発明の方法により細胞傷害性リンパ球を得た後、該リンパ球と固相とを分離するのみで、有効成分等と該リンパ球とを容易に分離することができ、該リンパ球への有効成分等の混入を防ぐことができる。

さらに、国際公開第02/14481号パンフレットに記載された、抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞の誘導に有効な酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖およびそれらの塩からなる群より選択される化合物や、下記(A)～(D)から選択される物質を前記成分と共に用いてもよい。

- (A) CD44に結合活性を有する物質
- (B) CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質
- (C) 成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質
- (D) 成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質

前記CD44に結合活性を有する物質としては、例えばCD44リガンドおよび/または抗CD44抗体が例示される。CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の阻害剤又は活性化剤が挙げられる。成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質としては、例えば成長因子に結合活性を有し、成長因子と複合体を形成することにより成長因子が成長因子レセプタ

ーに結合するのを阻害する物質、もしくは成長因子レセプターに結合活性を有し、成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質が挙げられる。さらに、成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の阻害剤又は活性化剤が挙げられる。これらの成分の培地中の濃度は、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。また、これらの成分は培地中に溶解して共存させる他、前記のような適切な固相に固定化して使用してもよい。

なお、上記の各種物質は単独で、もしくは2種以上混合して用いることができる。

本発明において前記有効成分の存在下とは、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持または拡大培養を行なう際に、前記有効成分がその機能を発揮し得る状態で存在することをいい、その存在状態は特に限定されるものではない。例えば、有効成分を使用する培地に溶解させる場合、培養を行う培地中における、本発明の有効成分の含有量は所望の効果が得られれば特に限定するものではないが、例えば、好ましくは0.0001～10000 μg/mL、より好ましくは0.001～10000 μg/mL、さらに好ましくは0.005～5000 μg/mL、特に好ましくは0.01～1000 μg/mLである。

本発明の製造方法によって得られた細胞傷害性リンパ球についてIL-2Rの発現量を測定すると、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なった細胞傷害性リンパ球に比較して有意なIL-2R発現量の増加が認められる。ここで、IL-2R発現量は公知の方法、例えば、抗IL-2R抗体を使用して測定することができる。

上記のように、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球はIL-2Rの発現量が増加している。IL-2Rは活性化T細胞表面に発現する活性化マーカーであり、この分子の発現に伴い、サイトカイン産生、細胞傷害活性、増殖活

性等が活性化される。よって、本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球は高い機能を有する細胞群である。

また、本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球は、IL-2Rの発現量が増加していることから、培地中に添加されたIL-2、あるいは細胞傷害性リンパ球の前駆細胞、リンパ球自体もしくは共存するその他の細胞が産生したIL-2による刺激に対する感受性が向上している。このため、IL-2の少ない環境下（例えば体内等）でも自ら活性化することができる。

さらに、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球では、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものに比べてCD8マーカーを有する（CD8陽性）細胞の存在する比率が高い。このことは、例えば、1. CD8陽性細胞はインターフェロン- $\gamma$ 等のサイトカインを産生して、免疫賦活を引き起こし、ヘルパーT細胞バランスをTh1系にする、2. CD8陽性細胞は細胞性免疫担当細胞であり、ウィルスや腫瘍細胞等の異物を効率よく排除することができる、3. CD8陽性細胞を得る場合は、従来はマグネットビーズやフローサイトメーターでCD8陽性細胞を精製していたが、本発明の方法では培養しながらCD8陽性細胞をエンリッチにすることができる、4. CD8陽性細胞比が多いことから、CTLを誘導する際の前駆細胞としての使用に適している、5. CD8陽性細胞比の少ない細胞集団からでも、CD8陽性細胞比率を高めながら培養することができる、等の利点がある。よって、本発明の方法は細胞傷害性リンパ球の調製において極めて有用である。

なお、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球におけるCD8陽性細胞の比率は、特に限定するものではないが、例えば抗CD8抗体を使用して測定することができる。

また、本発明の方法により調製された細胞傷害性リンパ球は培養後の細胞を長期間にわたって維持、あるいはこれを増殖させても、従来観察されたような高い

細胞傷害活性が維持されているという性質を有している。すなわち、該細胞傷害性リンパ球は、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを行なったものと比べて、細胞傷害活性が高く維持される。従って、培養された細胞傷害性リンパ球をクローン化することにより、安定した細胞傷害活性を有するリンパ球として維持することもできる。また、誘導された細胞傷害性リンパ球に抗原、各種サイトカイン、抗CD3抗体刺激を与えることにより増殖させ、拡大培養することができる。この細胞傷害性リンパ球の維持、拡大培養には、特に限定はなく、公知の方法を用いることができる。

上記の細胞傷害性リンパ球の維持とは、細胞傷害性リンパ球を細胞傷害活性を保ったままで維持することをいう。その際の培養条件に特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を適用することができる。例えば、37°C、5%CO<sub>2</sub>等の条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で培地を新鮮なものに交換することができる。使用される培地や、同時に使用されるその他の成分等は前記と同様である。

本発明の方法における細胞傷害性リンパ球の維持および拡大培養は、本発明の有効成分、すなわちフィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地中における血清及び血漿の総含有濃度が0容量%以上5容量%未満である培地中で細胞傷害性リンパ球をそれぞれ継続培養および拡大培養することを1つの大きな特徴とする。拡大培養によれば、細胞傷害性リンパ球の有する細胞傷害活性を維持させた状態でその細胞数を増加させることができる。すなわち、本発明の方法は、1つの態様として、細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法を提供する。

本発明の方法により得られる細胞傷害性リンパ球は所望の標的細胞を認識する能力を有しており、例えば標的となる細胞を、その細胞傷害活性により破壊する。この細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性は公知の方法により評価できる。例え

ば、放射性物質、蛍光物質等で標識した標的細胞に対する細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性を、細胞傷害性リンパ球により破壊された標的細胞に由来する放射活性や蛍光強度を測定することによって評価できる。また、細胞傷害性リンパ球や標的細胞より特異的に遊離されるGM-CSF、IFN- $\gamma$ 等のサイトカイン量を測定することにより検出することもできる。その他蛍光色素等によって標識された抗原ペプチド-MHC複合体の使用によって直接確認することもできる。この場合、例えば細胞傷害性リンパ球を細胞傷害性リンパ球特異性抗体とカップリングさせた第1蛍光マーカーと接触させた後に第2蛍光マーカーとカップリングさせた抗原ペプチド-MHC複合体を接触させ、そして二重標識細胞の存在をFACS (fluorescence-activated cell sorting) 分析することにより細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性を評価することができる。

さらに、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法の特徴として、低細胞数から培養を開始することが可能である。養子免疫療法を行うためには大量のリンパ球が必要となるが、患者から大量のリンパ球を取得することは困難である。また、通常の細胞傷害性リンパ球の拡大培養では、使用する細胞数に応じた適切な培養面積の細胞培養用器材の選択や、適切な培地量での培養が必要となる。すなわち、通常は細胞培養用器材における培養面積〔すなわち、培地に接触している器材表面部分の面積 (cm<sup>2</sup>)〕に対する細胞量 (個数) は  $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> 以上、細胞濃度は  $1 \times 10^6$  cells/mL 以上の高密度で培養が開始され、これ以下の細胞量条件では、拡大培養率〔拡大培養前の細胞数に対する拡大培養後の細胞数の比 (拡大培養後の細胞数/拡大培養前の細胞数)〕が非常に低くなり、大量の細胞傷害性リンパ球を得るまでに長期の培養期間を要する。よって、一般的には、例えば、小さな細胞培養用器材を用いて培養を開始した後、段階的に大きなスケールの細胞培養用器材を使用する、もしくは細胞培養用器材の数を増やして希釈操作を繰り返す等の方法により、大量のリンパ球を製造するのが現状である。このように、通常の細胞傷害性リンパ球の拡大培養では、複数

の培養系を必要とする。

本発明の方法により、少量の細胞量より開始された場合でも細胞培養用器材の大きさに関わらず、高い拡大培養率で培養を行うことができる。よって、従来のような面倒な細胞培養用器材や細胞培養液の交換、細胞培養液の希釈操作は不要となる。すなわち、本発明の方法によれば、1つの細胞培養用器材を用いた培養操作により、換言すれば、1つの培養系により、充分な細胞傷害性リンパ球の拡大培養を行なうことができる。よって、本発明の方法により、細胞培養液を希釈する工程を要しない細胞傷害性リンパ球の製造方法を実現することができる。特に、本発明の方法でLAK細胞を拡大培養する場合、大容量の細胞培養用器材にLAK細胞となり得る前駆細胞と培地を添加し、それ以降はIL-2を添加するのみでLAK細胞の拡大培養を行うことが可能である。簡便な操作で大量のLAK細胞を得ることができる点において、本発明は非常に有用である。この際、使用する本発明の有効成分としては、より高い拡大培養率を得るという観点から、好適にはフィブロネクチンフラグメントが使用できる。このように、本発明の方法によれば、短時間に必要量の細胞傷害性リンパ球を得ることができる。

例えば、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを、本発明の有効成分の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で低細胞数から開始する場合、培養開始時において、下記(a)および(b)から選択される条件を満たす低濃度もしくは低密度の細胞量を使用して行なうことができる。

(a) 使用する細胞培養用器材における培養面積に対する細胞量の比率が、好適には $1\text{ cell/cm}^2 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 、より好適には $10\text{ cells/cm}^2 \sim 1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 、特に好適には $1 \times 10^2 \text{ cells/cm}^2 \sim 5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ である。

(b) 培地中の細胞の濃度が、好適には $1\text{ cell/mL} \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 、より好適には $10\text{ cells/mL} \sim 1 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 、特に好適には $1 \times 10^2 \text{ cells/mL} \sim 5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ である

9

なお、ここで細胞量とは、細胞傷害性リンパ球および／または前駆細胞の個数をいう。

また、本発明の方法においては、細胞培養液の希釀操作の工程を要しない、細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養の少なくともいずれか1つを1つの培養系で行なう方法が例示される。

$11\text{ s/cm}^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/cm}^2$  という高濃度又は高密度な条件に設定される細胞傷害性リンパ球の製造をいう。なお、ここでいう細胞培養液を新鮮な培地で希釈する工程直後、培地を交換する工程直後、もしくは細胞培養用器材を交換する工程直後とは、培養開始時を包含するものではない。

このような高細胞数での培養が実施できる利点としては、使用する培地、血清・血漿等の培地添加物、細胞培養用器材、労力および培養スペースの削減が挙げられる。養子免疫療法では大量のリンパ球を必要とするため、使用される培地や細胞培養用器材が非常に多く必要となり、それに伴って大規模な培養スペースや多くの人員も必要となる。これらは養子免疫療法が普及する上で大きな課題となるものである。従って、本発明の方法はこのような課題を解決することができるから施設の設営、運営上、非常に有意義な発明である。

前述したとおり、本発明の方法は、低濃度もしくは低密度での細胞培養、高濃度もしくは高密度での細胞培養のいずれにも適用可能な方法であることから、本発明の方法を用いることにより、培養状況に応じてさまざまな細胞濃度もしくは細胞密度での細胞傷害性リンパ球の製造が可能となる。

また、本発明の方法においては、適切なフィーダ細胞と共に培養することもできる。細胞傷害性リンパ球をフィーダ細胞と共に培養する場合には、細胞傷害性リンパ球、フィーダ細胞の両者の維持、生育に適した培地であることが望ましい。当該培地としては、市販の培地が使用できる。

本発明の方法に使用されるフィーダ細胞は、抗CD3抗体と協同して細胞傷害性リンパ球を刺激し、T細胞レセプターを活性化するものであれば特に限定はない。本発明には、例えば、PBMCやエプスタイン-バールウィルスによって形質転換されたB細胞（EBV-B細胞）が使用される。通常、フィーダ細胞は放射線照射のような手段で増殖能を奪ったうえで使用される。なお、フィーダ細胞の培地中における含有量は公知の方法に従って決定すればよく、例えば、 $1 \times 10^5 \text{ cells/mL} \sim 1 \times 10^7 \text{ cells/mL}$  が好適である。

特に好ましい態様においては、フィーダ細胞として、非ウィルス感染細胞、例えば、E B V-B細胞以外のものが使用される。これにより、拡大培養された細胞傷害性リンパ球中にE B V-B細胞が混在する可能性を排除することができ、養子免疫療法のような細胞傷害性リンパ球を利用した医療の安全性を高めることができ可能となる。

また、本発明の方法においては、適切な抗原提示細胞と共に培養することもできる。抗原提示細胞は、抗原提示能を有する細胞に抗原ペプチドを付加し、その表面に抗原ペプチドを提示させることにより調製することができる〔例えば、ベンドナレク M. A. ら (Bendnarek M. A., et al.)、J. Immunol.、第147巻、第12号、第4047～4053頁 (1991) を参照〕。また、抗原提示能を有する細胞が抗原を処理 (process) する能力を有している場合には、当該細胞に抗原を負荷することにより、抗原が細胞内に取り込まれてプロセッシングを受け、断片化された抗原ペプチドが細胞表面に提示される。なお、抗原ペプチドを抗原提示能を有する細胞に付加する場合、使用される抗原提示細胞、誘導しようとする細胞傷害性リンパ球のMHC拘束性に合致する抗原ペプチドまたはMHC非拘束性の抗原ペプチドが使用される。

なお、本発明において使用される抗原は特に限定されるものではなく、例えば、細菌、ウィルスなどの外来性抗原や腫瘍関連抗原（癌抗原）などの内存性抗原等が挙げられる。

本発明においては、抗原提示細胞は非増殖性とすることが好ましい。細胞を非増殖性とするためには、例えばX線等の放射線照射またはマイトマイシン (mitomycin) 等の薬剤による処理を行えばよい。

本発明の製造方法によりLAK細胞を製造する場合、前記有効成分の存在下、IL-2とともにLAK細胞となり得る前駆細胞をインキュベートすることにより実施される。LAK細胞となり得る前駆細胞としては、特に限定されるもので

はなく、例えば末梢血単核球（P B M C）、N K細胞、臍帯血単核球、造血幹細胞、これらの細胞を含有する血液成分等が挙げられる。

また、L A K細胞を培養するための一般的な条件は、上記の培地を使用する点を除いては、公知の条件〔例えば、細胞工学、V o l . 1 4、N o . 2、p 2 2 3～2 2 7、（1 9 9 5 年）；細胞培養、1 7、（6）、p 1 9 2～1 9 5、（1 9 9 1 年）；THE L A N C E T、V o l . 3 5 6、p 8 0 2～8 0 7、（2 0 0 0）；C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y, s u p p l e m e n t 1 7, U N I T 7. 7 を参照〕に従えばよい。培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができ、例えば、3 7 ℃、5 % C O <sub>2</sub> 等の条件下で培養することができる。この培養は通常、2～1 5 日程度実施される。また、適当な時間間隔で細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養用器材を交換する工程を行っても良い。

上記のL A K細胞の誘導、維持、拡大培養と同様に、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に培養することにより、C T L、T I Lについても高い細胞傷害活性を有する細胞群を調製することができる。本発明においては、これらの細胞の活性化操作においてフィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を共存させ、かつ培地中における血清及び血漿の総含有濃度が0容量%以上5容量%未満である培地を使用する他には特に限定はなく、前記細胞の培養、活性化に適した培地を使用して実施することができる。フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の使用量、添加方法等については前記方法に準じて適切なものを選択すればよい。

なお、本発明の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法については、前記有効成分が、当該方法に使用される培養系に存在しており、さらに培地中の血清及び血漿の総含有濃度が0容量%以上5容量%未満であれば特に限定は無く、上記以外の従来の細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法において、その培養系に前記有効成分

を存在させて、さらに培地中の血清及び血漿の総含有濃度が0容量%以上5容量%未満であれば本発明に包含される。

本発明の方法により製造される細胞傷害性リンパ球を投与される疾患としては、特に限定はないが、例えば、癌、悪性腫瘍、肝炎や、インフルエンザ等のウィルス、細菌、カビが原因となる感染性疾患が例示される。また、後述のようにさらに外来遺伝子を導入した場合は、各種遺伝子疾患に対しても効果が期待される。また、本発明の方法により製造される細胞傷害性リンパ球は骨髄移植や放射線照射後の感染症予防を目的としたドナーリンパ球輸注等にも利用できる。

本発明の別の態様として、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有し、かつ培地中における血清及び血漿の総含有濃度が0容量%以上5容量%未満である細胞傷害性リンパ球培養用培地が提供される。当該培地は、さらにその他の任意の成分、たとえば、公知の細胞培養に用いられる培地成分、タンパク質、サイトカイン類（好適にはIL-2）、所望のその他の成分とからなる。なお、当該培地は、本発明の有効成分、および培地中の総含有濃度が0容量%以上5容量%未満となるように自己又は非自己の血清や血漿を用い、公知の方法に準じて製造することができる。当該培地中の本発明の有効成分等の含有量は、本発明の所望の効果が得られれば特に限定されるものではなく、例えば、本発明の方法に使用される前記培地中の有効成分等の含有量に準じて、所望により、適宜、決定することができる。本発明の培地の一態様としては、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固定化された細胞培養用担体を含有する培地、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固定化された細胞培養用器材に封入して提供される培地が包含される。

上記の細胞傷害性リンパ球の製造方法を用いて得られたリンパ球含有培養物中には、通常、ヘルパーT細胞等の細胞傷害性リンパ球以外の細胞も混在している。しかしながら、本発明により得られたリンパ球含有培養物中には細胞傷害活性

を保持するリンパ球が多く含まれているため、該培養物から遠心分離等により該培養物中の細胞を回収し、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球としてそのまま使用することができる。しかも、前記有効成分等を細胞培養用器材等に固定化しておけば、得られた細胞傷害性リンパ球における該成分等の混入の心配はない。

また、さらに該培養物から公知の方法により、細胞傷害性リンパ球を高含有する細胞集団（あるいは培養物）を分離し、本発明の方法により得られた細胞傷害性リンパ球として使用することもできる。すなわち、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法は、当該方法により得られた培養物から細胞傷害性リンパ球を高含有する細胞集団を選択する工程を含むことができる。

細胞傷害性リンパ球を高含有する該細胞集団の選択方法については特に限定はないが、例えば培養物から所望の細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD8抗体を結合させた細胞培養用器材もしくは担体を用いて目的の細胞のみを選択的に回収する方法や、フローサイトメーターを用いる方法が挙げられる。前記担体としては磁気ビーズやカラムが例示される。また、培養物から所望の細胞以外の細胞を吸着除去することにより、目的の細胞を高含有する細胞集団を得ることもできる。例えば、ヘルパーT細胞表面上に発現している細胞表面抗原に対する抗体、例えば抗CD4抗体を使用し、当該リンパ球培養物からヘルパーT細胞を除去することができる。この工程にはフローサイトメーターを用いることもできる。

さらに本発明は、上記の本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法で得られた、細胞傷害性リンパ球を提供する。当該リンパ球は高い細胞傷害活性を有しており、長期間にわたる継続培養や拡大培養を行っても細胞傷害活性の低下が少ないという性質を有する。また、本発明は、当該リンパ球を有効成分として含有する医薬（治療剤）を提供する。特に、当該リンパ球を含有する前記治療剤は養子免疫療法への使用に適している。養子免疫療法においては、患者の治療に適した細胞

傷害活性を有するリンパ球が、例えば静脈への投与によって患者に投与される。当該治療剤は前述の疾患やドナーリンパ球輸注での使用において非常に有用である。当該治療剤は製薬分野で公知の方法に従い、例えば、本発明の方法により調製された当該リンパ球を有効成分として、たとえば、公知の非経口投与に適した有機または無機の担体、賦形剤、安定剤等と混合することにより調製できる。なお、治療剤における本発明のリンパ球の含有量、治療剤の投与量、当該治療剤に関する諸条件は公知の養子免疫療法に従って適宜、決定できる。

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法においては、当該リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに包含することができる。すなわち、本発明は、その一態様として、細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む細胞傷害性リンパ球の製造方法を提供する。なお、「外来」とは、遺伝子導入対象のリンパ球に対して外来であることをいう。

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法、特に細胞傷害性リンパ球の拡大培養方法を行うことにより、培養されるリンパ球の増殖能が増強される。よって、本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法を、遺伝子の導入工程と組み合わせることにより、遺伝子の導入効率の上昇が期待される。

外来遺伝子の導入手段には特に限定はなく、公知の遺伝子導入方法により適切なものを選択して使用することができる。遺伝子導入の工程は、細胞傷害性リンパ球の製造の際、任意の時点で実施することができる。例えば、前記リンパ球の誘導、維持および／または拡大培養のいずれかの工程と同時に、あるいは該工程の後に実施するのが、作業効率の観点から好適である。

前記の遺伝子導入方法としては、ウイルスベクターを使用する方法、該ベクターを使用しない方法のいずれもが本発明に使用できる。それらの方法の詳細についてはすでに多くの文献が公表されている。

前記ウイルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使用される公知のウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルス

ベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクター等が使用される。特に好適には、ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスが使用される。上記ウイルスベクターとしては、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。

レトロウイルスベクターは、当該ベクターが導入される細胞の染色体DNA中に該ベクターに挿入されている外来遺伝子を安定に組み込むことができ、遺伝子治療等の目的に使用されている。当該ベクターは分裂、増殖中の細胞に対する感染効率が高いことから、本発明における、細胞傷害性リンパ球の製造工程、例えば、拡大培養の工程において遺伝子導入を行なうのに好適である。

ウイルスベクターを使用しない遺伝子導入方法としては、本発明を限定するものではないが、例えば、リポソーム、リガンドーポリリジンなどの担体を使用する方法やリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などを使用することができる。この場合にはプラスミドDNAや直鎖状DNAに組み込まれた外来遺伝子が導入される。

本発明において細胞傷害性リンパ球に導入される外来遺伝子には特に限定はなく、前記細胞に導入することが望まれる任意の遺伝子を選ぶことができる。このような遺伝子としては、例えば、タンパク質（例えば、酵素、サイトカイン類、レセプター類等）をコードするものの他、アンチセンス核酸やs i RNA（small interfering RNA）、リボザイムをコードするものが使用できる。また、遺伝子導入された細胞の選択を可能にする適当なマーカー遺伝子を同時に導入してもよい。

前記の外来遺伝子は、例えば、適当なプロモーターの制御下に発現されるようにベクターやプラスミド等に挿入して使用することができる。また、効率のよい遺伝子の転写を達成するために、プロモターや転写開始部位と協同する他の調

節要素、例えば、エンハンサー配列やターミネーター配列がベクター内に存在していてもよい。また、外来遺伝子を相同組換えにより導入対象のリンパ球の染色体へ挿入することを目的として、例えば、該染色体における該遺伝子の所望の標的挿入部位の両側にある塩基配列に各々相同性を有する塩基配列からなるフランкиング配列の間に外来遺伝子を配置させてもよい。導入される外来遺伝子は天然のものでも、または人工的に作製されたものでもよく、あるいは起源を異にするDNA分子がライゲーション等の公知の手段によって結合されたものであってもよい。さらに、その目的に応じて天然の配列に変異が導入された配列を有するものであってもよい。

本発明の方法によれば、例えば、がん等の患者の治療に使用される薬剤に対する耐性に関連する酵素をコードする遺伝子を細胞傷害性リンパ球に導入して該リンパ球に薬剤耐性を付与することができる。そのような細胞傷害性リンパ球を用いれば、養子免疫療法と薬剤療法とを組み合わせることができ、従って、より高い治療効果を得ることが可能となる。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、多剤耐性遺伝子 (multi drug resistance gene) が例示される。

一方、前記の態様とは逆に、特定の薬剤に対する感受性を付与するような遺伝子を細胞傷害性リンパ球に導入して、該薬剤に対する感受性を付与することもできる。かかる場合、生体に移植した後のリンパ球を当該薬剤の投与によって除去することが可能となる。薬剤に対する感受性を付与する遺伝子としては、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子が例示される。

### (3) CH-296Naについて

本発明においては、配列表の配列番号25に記載のアミノ酸配列 (x) (CH-296Na)、またはアミノ酸配列 (x)において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、付加もしくは置換したアミノ酸配列 (y) を有するポリペプチ

ドであって、アミノ酸配列（y）を有するポリペプチドがアミノ酸配列（x）を有するポリペプチドと同等な機能を有するものである、新規なポリペプチド、およびこれをコードする核酸も提供される。当該核酸としては、(1)配列番号26に記載の塩基配列からなるDNA（CH-296Naをコードする核酸）、(2)配列番号26に記載の塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換、挿入もしくは付加した塩基配列からなり、かつDNA(1)にコードされるポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドをコードするDNA、または(3)配列番号26に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつDNA(1)にコードされるポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドをコードするDNAからなる核酸が例示される。

なお、本明細書において、前記新規なポリペプチドを本発明のポリペプチドと称し、これをコードする核酸を本発明の核酸と称することがある。

以下、本発明のポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸、該ポリペプチドの製造方法について説明する。

本発明のポリペプチドは、前述のような細胞傷害性リンパ球の製造において所望の機能〔前記(i)～(i v)の機能〕のいずれかを有するものであれば、上記アミノ酸配列において1ないし複数個の置換、欠失、挿入あるいは付加の1以上が生じた配列のものも本発明のポリペプチドに含まれる。CH-296Na以外の本発明のポリペプチドとしては、好適には配列表の配列番号25に記載のアミノ酸配列に1～20個のアミノ酸の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたもの、より好適には1～10個のアミノ酸の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたもの、さらに好適には1～5個のアミノ酸の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたものが例示される。なお、アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチドの機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチドの物理化学的性状等を変化させ得る程度のものであってもよい。その詳細、該ポリペプチドの作製法は前記の通りである。

本発明のポリペプチドをコードする配列表の配列番号26で表される核酸は血漿由来のヒトフィブロネクチンをコードするcDNAを鑄型にPCR反応を行い、CH-296NaをコードするDNA断片として取得することができる。この際に使用されるプライマーとしては、特に限定はないが、例えば配列表の配列番号27、28に記載されるPrimer CH-296Na1、Primer CH-296Na2を使用することができる。また、当該核酸としては、前述のFERM BP-2800(CH-296をコードするプラスミドを保有する大腸菌)のプラスミドと、ネイティブの血漿由来のフィブロネクチンの細胞結合ドメインとヘパリン結合ドメインの間に存在する配列(第1図におけるIII型繰り返し配列の11)を有するDNA断片を適当な制限酵素サイトを用いて結合することにより取得することができる。

また、本発明の核酸としては、配列表の配列番号26で表される核酸の塩基配列において、1ないし複数個の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたものも含まれる。例えば配列表の配列番号26に記載の塩基配列から1~60塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたもの、より好適には1~30塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたもの、さらに好適には1~15塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたものが例示される。なお、塩基の置換等は、核酸にコードされるポリペプチドの機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチドの物理化学的性状等を変化させ得る程度のものであってもよい。その詳細、塩基の置換等の方法については前記のアミノ酸の置換等に関する記載に準ずる。

さらに配列番号26に記載の塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下ハイブリダイズし、本発明のポリペプチドと同等な機能、すなわち前述の細胞傷害性リンパ球の製造における前記(i)~(iv)の少なくともいずれかの機能を有するポリペプチドをコードする核酸も本発明の核酸に含まれる。上記「ストリンジェントな条件」とは特に限定されず、配列番号26に記載の塩基配列

からなるDNAにハイブリダイズさせるDNAに応じて、ハイブリダイゼーション時の、好ましくはさらに洗浄時の温度および塩濃度を適宜決定することにより設定し得るが、ストリンジエントな条件としては、例えば、モレキュラークローニング ア ラボラトリー マニュアル 第3版〔サンブルーク (s a m b r o o k) ら、M o l e c u l a r c l o n i n g, A l a b o r a t o r y m a n u a l 3<sup>rd</sup> e d i t i o n, 2 0 0 1年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s) 社発行〕等の文献に記載の条件が挙げられる。

具体的には、例えば、6×SSC (1×SSCは、0. 15M NaCl、0. 015M クエン酸ナトリウム、pH 7. 0) と0. 5% SDSと5×デンハルト [Denhardt's、0. 1%ウシ血清アルブミン (BSA)、0. 1%ポリビニルピロリドン、0. 1%フィコール400] と100 μg/mL サケ精子DNAとを含む溶液中、50℃、好ましくは65℃で保温する条件が例示される。前記の温度は用いるDNAのTm値が既知である場合は、その値より5～12℃低い温度としてもよい。さらに、非特異的にハイブリダイズしたDNAを洗浄により除去するステップ、ここで、より精度を高める観点から、より低イオン強度、例えば、2×SSC、よりストリンジエントには、0. 1×SSC等の条件および／またはより高温、例えば、用いられる核酸のTm値により異なるが、25℃以上、よりストリンジエントには、37℃以上、さらにストリンジエントには、42℃以上、よりさらにストリンジエントには、50℃以上等の条件下で洗浄を行なう、という条件等を追加してもよい。

より低いストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸分子もまた本発明に包含される。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーおよびシグナル検出の変化は、主として、ホルムアミド濃度 (より低い百分率のホルムアミドが、低下したストリンジエン

シーを生じる）、塩濃度、または温度の操作によって行われる。例えば、より低いストリンジエンシー条件は、 $6 \times \text{SSPE}$  ( $20 \times \text{SSPE} = 3\text{M NaCl}$  ;  $0.2\text{M NaH}_2\text{PO}_4$  ;  $0.02\text{M EDTA}$ , pH 7.4)、 $0.5\%$  SDS、 $30\%$  ホルムアミド、 $100\mu\text{g/mL}$  サケ精子プロッキングDNAを含む溶液中での $37^\circ\text{C}$ での一晩インキュベーション；次いで $1 \times \text{SSPE}$ 、 $0.1\%$  SDSを用いた $50^\circ\text{C}$ での洗浄を含む。さらに、より低いストリンジエンシーを達成するために、ストリンジエントなハイブリダイゼーション後に行われる洗浄は、より高い塩濃度（例えば、 $5 \times \text{SSC}$ ）で行うことができる。

上記の条件は、ハイブリダイゼーション実験においてバックグラウンドを抑制するために使用される代替的なプロッキング試薬を添加および／または置換することによって改変することができる。代表的なプロッキング試薬としては、デンハルト試薬、BLOTT<sup>TM</sup>、ヘパリン、変性サケ精子DNA、および市販の製品処方物が挙げられる。また、この改変に応じて、上記のハイブリダイゼーション条件の他の要素の改変が必要な場合もある。

一方、このようにして得られた核酸を用いて、配列表の配列番号25で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを遺伝子工学的に取得することができる。すなわち、当該核酸を適切な発現用ベクター、特に限定はないが、例えばpETベクターやpCol<sup>TM</sup>dベクター等に挿入し、公知の方法により、当該ポリペプチドを、例えば、大腸菌等で発現させることにより取得することができる。

## 実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。

### 製造例1 フィブロネクチンフラグメントの調製

#### (1) フィブロネクチンフラグメントの調製

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント H-271は、Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP-2264) より、米国特許第5, 198, 423号明細書に記載の方法により調製した。

また、ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント H-296、CH-271、CH-296はそれぞれ、Escherichia coli HB101/pHD102 (FERM BP-7420)、Escherichia coli HB101/pCH101 (FERM BP-2799)、Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800) を用い、これを上記の明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント C-274は、Escherichia coli JM109/pTF7221 (FERM BP-1915) を用い、これを米国特許第5, 102, 988号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント C-CS1は、Escherichia coli HB101/pCS25 (FERM BP-5723) を用い、日本特許3104178号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-89、CHV-179は、それぞれEscherichia coli HB101/pCHV89 (FERM P-12182)、Escherichia coli HB101/pCHV179 (FERM P-12183) を用い、日本特許2729712号明細書に記載の方法で培養し、該培養物より調製した。

また、ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-90は日本特許2729712号明細書に記載の方法で調製した。すなわち、当該明細書に記載の操作によってプラスミドpCHV90を構築したうえ、該プラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物よりCHV-90を調製した。

ヒトフィブロネクチン由来のフラグメント CHV-181は、国際公開第97/18318号パンフレットに記載の方法で、CHV-181をコードするDNAを含有するプラスミド（pCHV181）を構築した後、該プラスミドを導入された大腸菌（Escherichia coli HB101/pCHV181）を培養し、該培養物より、上記のCHV-179と同様の方法で調製した。

#### （2）CHV-92の調製

上記のポリペプチドCHV-181を発現させるためのプラスミド pCHV181について、CHV-181をコードする領域中のIII-13領域をコードする領域を欠失したプラスミドCHV92を構築した。欠失操作は日本特許2729712号明細書に記載の、プラスミドpCHV179からのIII-14コード領域の欠失操作に準じて行った。

上記のプラスミドpCHV92で形質転換された大腸菌HB101（Escherichia coli HB101/pCHV92）を培養し、該培養物より日本特許第2729712号明細書に記載のCHV-89ポリペプチドの精製方法に準じて精製操作を行い、精製CHV-92標品を得た。

#### （3）H-275-Cysの調製

ポリペプチドH-275-Cysを発現させるためのプラスミドは以下に示す操作に従って構築した。Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800) よりプラスミドpCH102を調製した。このプラスミドを鋳型とし、配列表の配列番号21に塩基配列を示すプライマー12Sと配列表の配列番号22に塩基配列を示すプライマー14Aとを用いたPCRを行い、フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインをコードする約0.8kbのDNA断片を得た。得られたDNA断片をNcoI、BamHI（ともにタカラバイオ社製）で消化した後、NcoI、BamHIで消化したpTV118N（タカラバイオ社製）とライゲーションすることにより、プラスミドpRH

1を構築した。

プラスミドベクターpINI11-ompA<sub>1</sub>〔グーライエプ J. ら (G h r a y e b J., et al.)、EMBO J.、第3巻、第10号、第2437～2442頁(1984)〕をBamHIとHincII(タカラバイオ社製)とで消化し、リポプロテインターミネーター領域を含む約0.9kbのDNA断片を回収した。これをBamHIとHincIIで消化した上記のプラスミドpRH1と混合してライゲーションを行い、lacプロモーター、ヘパリン結合ドメインをコードするDNA断片およびリポプロテインターミネーターをこの順に含むプラスミドpRH1-Tを得た。

このプラスミドpRH1-Tを鋳型とし、配列表の配列番号23に塩基配列を示すプライマーCys-Aと配列表の配列番号24に塩基配列を示すプライマーCys-Sとを用いたPCR反応の後、回収した増幅DNA断片をNotI(タカラバイオ社製)で消化し、さらに該DNA断片をセルフライゲーションさせた。こうして得られた環状DNAをSpeIとScaI(タカラバイオ社製)とで消化して得られる2.3kbのDNA断片と、プラスミドpRH1-TをSpeIとScaI(タカラバイオ社製)とで消化して得られる2.5kbのDNA断片とを混合してライゲーションを行い、プラスミドpRH-Cysを得た。該プラスミドには、前記のH-271のN末端側にMet-Ala-Ala-Serの4アミノ酸が付加され、さらにC末端にCysが付加されたポリペプチドH-275-Cysがコードされている。

ポリペプチドH-275-Cysは以下の方法により調製した。上記のプラスミドpRH-Cysで形質転換された大腸菌HB101(Escherichia coli HB101/pRH-Cys)を120mLのLB培地中、37℃で1晩培養した。培養液より回収した菌体を40mLの破碎用緩衝液(50mM Tris-HCl、1mM EDTA、150mM NaCl、1mM DTT、1mM PMSF、pH7.5)に懸濁し、超音波処理を行って菌体を破

碎した。遠心分離を行って得られた上清を精製用緩衝液（50 mM Tris-HCl、pH 7.5）で平衡化されたハイトラップ-ヘパリンカラム（ファルマシア社製）にかけた。同緩衝液でカラム内の非吸着画分を洗浄した後、0～1 M NaCl 濃度勾配を持つ精製用緩衝液で溶出を行った。溶出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、H-275-Cys の分子量に相当する画分を集めて精製H-275-Cys 標品を得た。

#### 実施例 1 低血清培地を用いたLAK細胞（Lymphokine-activated killer cells）培養系における拡大培養率の測定

##### （1）PBMCの分離および保存

インフォームド・コンセントの得られたヒト健常人ドナーより成分採血を実施後、採血液をPBS（-）で2倍希釀し、Ficoll-paque（ファルマシア社製）上に重層して500×gで20分間遠心分離した。中間層の末梢血単核細胞（PBMC）をピペットで回収、洗浄した。採取したPBMCは90% FBS（Bio Whittaker社製）／10%DMSO（SIGMA社製）からなる保存液に懸濁し、液体窒素中にて保存した。LAK誘導時にはこれら保存PBMCを37℃水浴中にて急速融解し、10 μg/mL DNase（Calbiochem社製）を含むRPMI1640培地（Bio Whittaker社製）で洗浄後、トリパンブルー染色法にて生細胞数を算出して各実験に供した。

##### （2）抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち24穴細胞培養プレートまたは12.5 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコ（Falcon社製）に抗ヒトCD3抗体（ヤンセン協和社製）（終濃度5 μg/mL）を含むPBSを1mL（24穴プレートの場合）または2mL（12.5 cm<sup>2</sup> フラスコの場合）ずつ添加した。この時、FNフラグメント添加

群には製造例 1 に記載の各フィプロネクチンフラグメント (F N f r) を終濃度  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  (24穴プレートの場合) または  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  (12.5cm<sup>2</sup> フラスコの場合) となるように添加した。対照として、F N f r を添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で 5 時間インキュベート後、使用時まで 4℃ で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・F N f r を含む P B S を吸引除去後、各ウェルを P B S で 2 回、X V I V O 2 0 培地 (B i o w h i t t a k e r 社製) で 1 回洗浄し各実験に供した。

### (3) L A K 細胞の誘導および培養

1% human A B 血清を含む X V I V O 2 0 (以下 1% X V I V O 2 0 と略す) に  $1 \times 10^6$  c e l l s /mL となるように実施例 1 - (1) で調製した P B M C を懸濁後、実施例 1 - (2) で調製した抗ヒト C D 3 抗体固定化プレート、または抗ヒト C D 3 抗体および F N f r 固定化プレートに 1 mL / ウエルずつまき、終濃度  $1000 \text{U}/\text{mL}$  となるように I L - 2 (塩野義製薬社製) を添加した。これらのプレートを 5% C O<sub>2</sub> 中 37℃ で培養した (培養 0 日目)。培養開始後 2 日目、3 日目には  $1000 \text{U}/\text{mL}$  の I L - 2 を含む 1% X V I V O 2 0 を 1 mL / ウエルずつ添加した。培養開始後 4 日目には適宜 1% X V I V O 2 0 を用いて希釀した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度  $500 \text{U}/\text{mL}$  となるよう I L - 2 を添加した。培養を継続し、2 ~ 3 日毎に培養開始 4 日目と同様に適宜 1% X V I V O 2 0 を用いて希釀し終濃度  $300 \sim 500 \text{U}/\text{mL}$  となるよう I L - 2 を添加した。培養開始後 11 日目または 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表 1 に示す。

表 1

血清濃度 (%)	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率
1	11日間	対照 (FNfr 非固定化)	× 252
1	11日間	CH-296	× 670
1	11日間	H-296	× 615.6
1	15日間	対照 (FNfr 非固定化)	× 403.2
1	15日間	CH-296	× 588
1	15日間	H-296	× 708

表 1 に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いての LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して LAK 細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いた LAK 細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

## 実施例 2 低血清培地を用いた LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）

### (1) LAK 細胞の誘導および培養

0.5% または 1% X V I V O 20 に  $1 \times 10^6$  c e l l s / mL となるように実施例 1 - (1) で調製した P B M C を懸濁後、実施例 1 - (2) で調製した抗ヒト CD 3 抗体固定化プレート、または抗ヒト CD 3 抗体および FNfr 固定化プレートに 1 mL / ウェルずつまき、終濃度 1 0 0 0 U / mL となるように I L - 2 (塩野義製薬社製) を添加した。これらのプレートを 5% CO<sub>2</sub> 中 37°C で培養した (培養 0 日目)。培養開始後 2 日目、3 日目には 1 0 0 0 U / mL の I L - 2 を含む 0.5% または 1% X V I V O 20 を 1 mL / ウェルずつ添加した。培養開始後 4 日目には適宜 0.5% または 1% X V I V O 20 を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度 5 0 0 U / mL となるよう I L - 2 を添加した。培養開始 9 日目には実施例 1 - (2) と同様

の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコ（ただし、固定化に用いる抗ヒトCD3抗体の濃度は0.5μg/mLとした）に適宜0.5%または1%XVIVO20を用いて希釈した培養液を移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始12日目に再度適宜0.5%または1%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始15日にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表2に示す。

表2

血清濃度 (%)	フィプロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始9日目 刺激	拡大培養率 (倍率)
0.5	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×13
0.5	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×88
0.5	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×410
1	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×403
1	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×1624
1	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	×588
1	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×3560
1	H-296	抗CD3+H-296	なし	×708
1	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	×3000

表2に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィプロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィプロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を

誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

**実施例 3 低血清培地を用いた LAK 細胞培養系における IL-2 レセプター (IL-2R) 発現の誘導**

**(1) LAK 細胞の誘導および培養**

実施例 2-(1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。

**(2) LAK 細胞における IL-2R 発現率の測定**

実施例 3-(1) で調製した  $2 \times 10^5$  cells の LAK 細胞を 1% パラホルムアルデヒド (ナカライトスク社製) を含む PBS (ニッスイ社製) を用いて固定した後、PBS で洗浄した。固定細胞を 1% BSA (SIGMA 社製) を含む  $100 \mu\text{L}$  の PBS 中に懸濁し、FITC 標識マウス IgG1 もしくは FITC 標識マウス抗ヒト IL-2R (CD25) 抗体 (ともに DAKO 社製) を添加後、氷上で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を PBS で洗浄し、再度 1% パラホルムアルデヒドを含む PBS に懸濁した。この細胞を FACS Vantage (ベクトン・ディッキンソン社製) を用いたフローサイトメトリーに供し、IL-2R 発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表 3 に示す。かかる表では IL-2R 発現陽性細胞含有率 (%) を IL-2R 発現率 (%) と表示する。

表 3

血清濃度 (%)	フィプロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	IL-2R 発現率 (%)
0.5	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	なし	3.48
0.5	FNfr 非固定化	抗 CD3	抗 CD3	43.22
0.5	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	81.11
0.5	H-296	抗 CD3+H-296	抗 CD3+H-296	71.49
1	対照 (FNfr 非固定化)	抗 CD3	なし	8.02
1	FNfr 非固定化	抗 CD3	抗 CD3	42.8
1	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	77.94
1	H-296	抗 CD3+H-296	抗 CD3+H-296	70.29

表3に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例4 低血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

##### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

##### (2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(1)で調製した $2 \times 10^5$  cellsのLAK細胞を1%パラホルムアルデヒドを含むPBSを用いて固定した後、PBSで洗浄した。固定細胞を1%BSAを含む $100\mu\text{L}$ のPBS中に懸濁し、FITC標識マウスIgG1もしくはFITC標識マウス抗ヒトCD8抗体(ともにDAKO社製)を添加後、氷上で30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をPBSで洗浄し、再度1%パラホルムアルデヒドを含むPBSに懸濁した。この細胞をFACS Vantageを用いたフローサイトメトリーに供し、CD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表4に示す。

表4

血清濃度 (%)	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	C D 8 陽性細胞 含有率 (%)
0. 5	対照 (F N f r 非固定化)	抗CD3	抗CD3	2 6. 9 5
0. 5	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	4 4. 6 7
1	対照 (F N f r 非固定化)	抗CD3	なし	5 3. 2 6
1	F N f r 非固定化	抗CD3	抗CD3	3 5. 5 6
1	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	6 1. 2 9
1	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	6 2. 5 8

表4に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのL A K細胞誘導初期または初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のL A K細胞中におけるC D 8 陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてL A K細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、L A K細胞中のC D 8 陽性細胞の含有率を高くしながらL A K細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例5 無血清培地を用いたL A K細胞培養系における拡大培養率の測定

##### (1) L A K細胞の誘導および培養

血清を含まないX V I V O 2 0 (以下0 % X V I V O 2 0と略す)に $1 \times 1 0^6$  c e l l s /mLとなるように実施例1-(1)で調製したP B M Cを懸濁後、実施例1-(2)で調製した抗ヒトC D 3抗体固定化プレート、または抗ヒトC D 3抗体およびF N f r 固定化プレートに1 mL /ウェルずつまき、終濃度1 0 0 0 U /mLとなるようにI L - 2を添加した。これらのプレートを5 % C O<sub>2</sub>中3 7 °Cで培養した(培養0日目)。培養開始後2日目、3日目には1 0 0 0 U /mLのI L - 2を含む0 % X V I V O 2 0を1 mL /ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜0 % X V I V O 2 0を用いて希釀した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度5 0 0 U /mLとなるようI L -

2を添加した。培養を継続し、2～3日毎に培養開始4日目と同様に適宜0%X VIVO20を用いて希釈し終濃度300～500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始後11日目または15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表5に示す。

表5

血清濃度(%)	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
0	11日間	対照(FNfr非固定化)	36
0	11日間	CH-296	103.7
0	15日間	対照(FNfr非固定化)	76.3
0	15日間	CH-296	134.6
0	15日間	対照(FNfr非固定化)	28.8
0	15日間	H-296	46.8

表5に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を含まない培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

#### 実施例6 無血清培地でのLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(繰り返し刺激による拡大培養)

##### (1) LAK細胞の誘導および培養

0%XVIVO20に $1 \times 10^6$  cells/mLとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例1-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1mL/ウェルずつまき、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO<sub>2</sub>中37℃で培養した(培養0日目)。培養開

始後2日目、3日目には1000U/mLのIL-2を含む0%XVIVO20を1mL/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始9日目には実施例1-(2)と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコ(ただし、固定化に用いる抗ヒトCD3抗体の濃度は0.5μg/mLとした)に適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始12日目に再度適宜0%XVIVO20を用いて希釈した培養液を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表6に示す。

表6

血清濃度 (%)	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日目 刺激	培養開始9日目 刺激	拡大培養率 (倍率)
0	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×29
0	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×36
0	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	×56
0	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×199
0	H-296	抗CD3+H-296	なし	×47
0	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	×209

表6に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィ

プロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、血清を含まない培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例7 無血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2R発現の誘導

##### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例6-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

##### (2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表7に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

表7

血清濃度 (%)	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	IL-2R発現率 (%)
0	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	1.7
0	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	50.5
0	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	3.0
0	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	82.2
0	H-296	抗CD3+H-296	なし	3.2
0	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	91.9

表7に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 8 無血清培地（A I M V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

（1）LAK細胞の誘導および培養

実施例 5 – (1) と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないA I M V培地（インビトロジエン社製、以下0% A I M Vと略す）に変更した。結果を表8に示す。

表8

血清濃度・培地	培養日数	フィプロネクチンフラグメント	拡大培養率（倍率）
0% A I M V	12日間	対照（F N f r 非固定化）	× 2 1
0% A I M V	12日間	CH-296	× 1 1 0
0% A I M V	15日間	対照（F N f r 非固定化）	× 4 4
0% A I M V	15日間	CH-296	× 4 9 8
0% A I M V	12日間	対照（F N f r 非固定化）	増殖せず測定不能
0% A I M V	12日間	H-296	× 3 3
0% A I M V	15日間	対照（F N f r 非固定化）	増殖せず測定不能
0% A I M V	15日間	H-296	× 2 4 5

表8に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。またこの効果は無血清培養用の基本培地を変えても発揮される。このことから各フィプロネクチンフラグメントは血清を含まない培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例 9 無血清培地でのLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（低細胞数からのLAK細胞誘導・培養／希釈操作なしでの培養）

（1）LAK細胞の誘導および培養

X V I V O 2 0（血清を含まない）に $1 \times 10^5$  cells/mLとなるように実施例1 – (1) で調製したP B M Cを懸濁後、実施例1 – (2) と同様の方

法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化6ウェルプレートに1mL／ウェルずつまき、XVIVO20（血清を含まない）4mLを加え（ $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>）、さらに終濃度500U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO<sub>2</sub>中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目、3日目、4日目には終濃度500U/mLとなるようにIL-2を添加した。培養を継続し、培養開始後7日目以降2～3日毎に終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。この間培養液の希釈操作は全く行わなかった。

培養開始後15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率を算出した。結果を表9に示す。

表9

培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率（倍率）
15日間	対照（FNfr非固定化）	増殖しないため測定不可能
15日間	CH-296	×64.3

表9に示されるように、低細胞数からのLAK細胞誘導時に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、誘導途中の細胞の希釈操作を必要とすることなしに培養開始後15日目に高い拡大培養率が得られた。これに対して対照群では培養開始15日目でもほとんど増殖しなかった。すなわち無血清培地を用いて低細胞数からLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、全く希釈操作を必要とすることなく、高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例10 無血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2R発現の誘導（低細胞数からのLAK細胞誘導・培養／希釈操作なしでの培養）

#### （1）LAK細胞の誘導および培養

実施例 9 - (1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。

(2) LAK 細胞における IL-2R 発現率の測定

実施例 3 - (2) と同様の方法で、 IL-2R 発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表 10 に示す。かかる表では IL-2R 発現陽性細胞含有率 (%) を IL-2R 発現率 (%) と表示する。

表 10

培養日数	フィブロネクチンフラグメント	IL-2R 発現率 (%)
15 日間	対照 (FNf <sub>r</sub> 非固定化)	増殖しないため測定不可能
15 日間	CH-296	98.0

表 10 に示されるように、低細胞数からの LAK 細胞誘導時に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、誘導途中の細胞の希釈操作を必要とすることなしに培養中の LAK 細胞表面上における IL-2R 発現率を高く誘導することができた。すなわち無血清培地を用いて低細胞数から LAK 細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、全く希釈操作を必要とすることなく、 IL-2R 発現率を高くしながら LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 11 無血清培地 (AIM-V) を用いて培養した LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 8 - (1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。

(2) LAK 細胞における CD8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4 - (2) と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 11 に示す。

表11

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	CD 8陽性細胞含有率 (%)
0% A I M V	対照 (FNfr非固定化)	24.7
0% A I M V	CH-296	45.8
0% A I M V	H-296	62.6

表11に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD 8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD 8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例12 低血清培地 (A I M V) を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

##### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を1%または5%humanAB血清を含むA I M V培地(以下、1% A I M Vまたは5% A I M Vと略す)に変更した。結果を表12に示す。

表12

血清濃度・培地	培養日数	フィプロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
1%AIM V	11日間	対照(FNfr非固定化)	×7
1%AIM V	11日間	CH-296	×156
1%AIM V	11日間	H-296	×39
1%AIM V	15日間	対照(FNfr非固定化)	×3
1%AIM V	15日間	CH-296	×651
1%AIM V	15日間	H-296	×305
5%AIM V	11日間	対照(FNfr非固定化)	×454
5%AIM V	11日間	CH-296	×1087
5%AIM V	11日間	H-296	×727
5%AIM V	15日間	対照(FNfr非固定化)	×778
5%AIM V	15日間	CH-296	×1548
5%AIM V	15日間	H-296	×882

表12に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地(AIM V)を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだAIM V培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

### 実施例13 種々の低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の効果

#### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を1%humanAB血清を含むXVIVO20培地・XVIVO10培地またはAIM V培地(以下それぞれ1%XVIVO20・1%XVIVO10または1%AIM Vと略す)に変更し、各培地における拡大培養率を測定した。結果を表13に示す。

表13

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
1% X V I V O 2 0	1 1 日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 4 9
1% X V I V O 2 0	1 1 日間	C H - 2 9 6	× 1 5 3
1% A I M V	1 1 日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 7 9
1% A I M V	1 1 日間	C H - 2 9 6	× 8 3 2
1% X V I V O 2 0	1 5 日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 2 7 2
1% X V I V O 2 0	1 5 日間	C H - 2 9 6	× 5 1 3
1% X V I V O 1 0	1 5 日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 1 1 3
1% X V I V O 1 0	1 5 日間	C H - 2 9 6	× 1 6 2
1% A I M V	1 5 日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 7 4 4
1% A I M V	1 5 日間	C H - 2 9 6	× 8 9 2 8

表13に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。またこの効果は基本培地を変えても発揮される。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだいずれの培地を用いたLAK細胞培養時にも好適に使用されることが明らかとなった。

#### 実施例14 低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

##### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を0.2% human AB血清を含むX V I V O 2 0 培地に変更した。結果を表14に示す。

表14

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
0.2% X V I V O 2 0	1 5 日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 1 1
0.2% X V I V O 2 0	1 5 日間	C H - 2 9 6	× 6 7

表14に示されるように、低濃度（0.2%）の血清を含んだ培地（XVIVO20）を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

#### 実施例15 低血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）

##### （1）LAK細胞の誘導および培養

実施例2-（1）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2%humanAB血清を含むXVIVO20培地または1%humanAB血清を含むXVIVO10に変更した。結果を表15に示す。

表15

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日目 刺激	拡大培養率 (倍率)
0.2%XVIVO20	対照（FNfr非固定化）	抗CD3	なし	×11
0.2%XVIVO20	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×9
0.2%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×86
1%XVIVO10	対照（FNfr非固定化）	抗CD3	なし	×113
1%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×281
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×1282
1%XVIVO10	対照（FNfr非固定化）	抗CD3	なし	×24
1%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×367
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×1030
1%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	×1001

表15に示されるように、低濃度の血清（0.2%）を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較

してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。またこの効果は基本培地を変えても発揮される。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例16 低血清培地を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター(IL-2R)発現の誘導

##### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2%humanAB血清を含むXVIVO20培地または1%humanAB血清を含むXVIVO10に変更した。

##### (2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表16に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

表16

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	IL-2R 発現率 (%)
0.2%XVIVO20	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	3.01
0.2%XVIVO20	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	59.08
0.2%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	77.88
1%XVIVO10	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	13.77
1%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	58.28
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	91.11

表16に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えて発揮される。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例17 低血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

##### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2%もしくは1%humanAB血清を含むXVIVO20培地または1%humanAB血清を含むXVIVO10に変更した。

##### (2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表17に示す。

表17

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率(%)
0.2%XVIVO20	対照(FNfr非固定化)	50.9
0.2%XVIVO20	CH-296	70.9
1%XVIVO20	対照(FNfr非固定化)	36.2
1%XVIVO20	CH-296	53.6
1%XVIVO20	H-296	50.6
1%XVIVO10	対照(FNfr非固定化)	19.9
1%XVIVO10	CH-296	45.5
1%XVIVO10	H-296	53.6

表17に示されるように、低血清を含む培地を用いてのLAK細胞誘導初期に

各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えて発揮された。すなわち低濃度の血清を含む培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

**実施例18 低血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率（繰り返し刺激による拡大培養）**

**（1）LAK細胞の誘導および培養**

実施例2-（1）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0.2%human AB血清を含むXVIVO20培地または1%human AB血清を含むXVIVO10に変更した。

**（2）LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定**

実施例4-（2）と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表18に示す。

表18

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	CD8陽性細 胞含有率 (%)
0.2%XVIVO20	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	38.9
0.2%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	44.5
1%XVIVO10	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	25.6
1%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	38.3

表18に示されるように、低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期または中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えて発揮された。すな

わち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

### 実施例19 無血清培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定

#### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例5-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないXVIVO10培地またはAIM-V培地に変更した。結果を表19に示す。

表19

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率(倍率)
0%XVIVO10	11日間	対照(FNfr非固定化)	×32
0%XVIVO10	11日間	CH-296	×95
0%XVIVO10	15日間	対照(FNfr非固定化)	×205
0%XVIVO10	15日間	CH-296	×407
0%XVIVO10	11日間	対照(FNfr非固定化)	×29
0%XVIVO10	11日間	H-296	×78
0%XVIVO10	15日間	対照(FNfr非固定化)	×27
0%XVIVO10	15日間	H-296	×194
0%AIM-V	11日間	対照(FNfr非固定化)	×25
0%AIM-V	11日間	CH-296	×85
0%AIM-V	11日間	H-296	×69
0%AIM-V	15日間	対照(FNfr非固定化)	×61
0%AIM-V	15日間	CH-296	×202
0%AIM-V	15日間	H-296	×392

表19に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を

含まない培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなつた。

**実施例20 無血清培地でのLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（繰り返し刺激による拡大培養）**

**（1）LAK細胞の誘導および培養**

実施例6－（1）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないXVIVO10培地に変更した。結果を表20に示す。

表20

血清濃度・培地	フィプロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	拡大培養率 (倍率)
0%XVIVO10	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	×27
0%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	×288
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×845
0%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	×893

表20に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィプロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィプロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、血清を含まない培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなつた。

実施例 2 1 無血清培地を用いた LAK 細胞培養系における IL-2R 発現の誘導

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 6-(1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まない X V I V O 1 0 培地に変更した。

(2) LAK 細胞における IL-2R 発現率の測定

実施例 3-(2) と同様の方法で、IL-2R 発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表 2 1 に示す。かかる表では IL-2R 発現陽性細胞含有率(%)を IL-2R 発現率(%)と表示する。

表 2 1

血清濃度・培地	フィプロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	IL-2R 発現率 (%)
0%XVIV010	対照 (F N f r 非固定化)	抗 CD3	なし	24.99
0%XVIV010	F N f r 非固定化	抗 CD3	抗 CD3	80.58
0%XVIV010	CH-296	抗 CD3+CH-296	なし	40.17
0%XVIV010	CH-296	抗 CD3+CH-296	抗 CD3+CH-296	92.59
0%XVIV010	H-296	抗 CD3+H-296	なし	30.09
0%XVIV010	H-296	抗 CD3+H-296	抗 CD3+H-296	87.15

表 2 1 に示されるように、血清を含まない培地を用いての LAK 細胞誘導初期および中期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中の LAK 細胞表面上における IL-2R 発現率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いて LAK 細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R 発現率を高くしながら LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

実施例 2 2 無血清培地を用いて培養した LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率

## (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例5-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないXVIVO20またはXVIVO10またはAIMV培地に変更した。

## (2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表22に示す。

表22

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率(%)
0%XVIVO20	対照(FNfr非固定化)	20.01
0%XVIVO20	CH-296	64.48
0%XVIVO10	対照(FNfr非固定化)	27.91
0%XVIVO10	CH-296	47.72
0%AIMV	対照(FNfr非固定化)	21.14
0%AIMV	CH-296	58.8
0%XVIVO10	対照(FNfr非固定化)	16.53
0%XVIVO10	CH-296	35.22
0%XVIVO10	H-296	27.29

表22に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

## 実施例23 無血清培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率(繰り返し刺激による拡大培養)

### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例6-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。ただし、この際使用する培地を血清を含まないXVIVO20またはXVIVO10培地に変更した。

### (2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表23に示す。

表23

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	CD8陽性 細胞含有率 (%)
0%XVIVO20	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	20.01
0%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	64.48
0%XVIVO20	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	35.21
0%XVIVO10	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	27.91
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	47.72
0%XVIVO10	FNfr非固定化	抗CD3	抗CD3	37.97
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	50.22
0%XVIVO10	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	16.53
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	35.22
0%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	なし	27.29
0%XVIVO10	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	75.33
0%XVIVO10	H-296	抗CD3+H-296	抗CD3+H-296	61.08

表23に示されるように、血清を含まない培地を用いてのLAK細胞誘導初期または初期中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。またこの効果は基本培地を変えて発揮された。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかと

なった。

**実施例 2 4 低血清培地を用いた L A K 細胞培養系における I L - 2 R 発現の誘導（低細胞数からの L A K 細胞誘導・培養／希釈操作なしでの培養）**

**（1） L A K 細胞の誘導および培養**

1 % h u m a n A B 血清を含む X V I V O 2 0 （以下 1 % X V I V O 2 0 と省略）に  $1 \times 1 0^5$  c e l l s / mL または  $5 \times 1 0^4$  c e l l s / mL となるよう に実施例 1 - (1) で調製した P B M C を懸濁後、実施例 1 - (2) と同様の方法で調製した抗ヒト C D 3 抗体固定化プレート、または抗ヒト C D 3 抗体および F N f r 固定化 6 ウエルプレートに 1 mL / ウエルずつまき、1 % X V I V O 2 0 4 mL を加え ( $1 \times 1 0^4$  c e l l s /  $\text{cm}^2$  または  $5 \times 1 0^3$  c e l l s /  $\text{cm}^2$  ) 、さらに終濃度 5 0 0 U / mL となるように I L - 2 （塩野義製薬社製）を添加した。これらのプレートを 5 % C O<sub>2</sub> 中 3 7 °C で培養した（培養 0 日目）。培養開始後 2 日目、3 日目、4 日目には終濃度 5 0 0 U / mL となるように I L - 2 を添加した。培養を継続し、培養開始後 7 日目以降 2 ~ 3 日毎に終濃度 5 0 0 U / mL となるよう I L - 2 を添加した。この間培養液の希釈操作は全く行わなかった。培養開始後 1 6 日目に細胞を回収した。

**（2） L A K 細胞における I L - 2 R 発現率の測定**

実施例 3 - (2) と同様の方法で、I L - 2 R 発現陽性細胞含有率を測定した。かかる表では I L - 2 R 発現陽性細胞含有率（%）を I L - 2 R 発現率（%）と表示する。結果を表 2 4 に示す。

表 2 4

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	I L - 2 R 発現率（%）
1 % X V I V O 2 0	対照 (F N f r 非固定化)	1 2. 1 5
	C H - 2 9 6	9 7. 4 7
	H - 2 9 6	9 5. 4 3

表24に示されるように、低細胞数からのLAK細胞誘導時に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、誘導途中の細胞の希釈操作を必要とすることなしに培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低血清培地を用いて低細胞数からLAK細胞を誘導する際にフィプロネクチンフラグメントを共存させることにより、全く希釈操作を必要とすることなく、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例25 無血清・低血清培地を用いたLAK細胞培養系における細胞傷害活性の測定

##### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0%から5%humanAB血清を含むXVIVO20または0%から5%humanAB血清を含むAIM-V培地または5%humanAB血清を含むXVIVO10培地に変更した。

##### (2) 培養したLAK細胞の細胞傷害活性の測定

実施例25-(1)で調製した培養後15日目のLAKの細胞傷害活性は、Calcein-AMを用いた細胞傷害活性測定法〔リヒテンフェルズ R. ら (Lichtenfels R., et al.)、J. Immunol. Methods、第172巻、第2号、第227~239頁(1994)〕にて評価した。細胞株K562、Daudiを $1 \times 10^6$  cells/mLとなるよう5%FBS(Bio Whittaker社製)を含むRPMI1640培地に懸濁後、終濃度25μMとなるようにCalcein-AM(ドータイト社製)を添加し、37℃で1時間培養した。細胞をCalcein-AMを含まない培地にて洗浄後、Calcein標識標的細胞とした。

実施例25-(1)で調製したLAK細胞をエフェクター細胞として $1 \times 10$

$^6 \sim 3 \times 10^6$  cells/mL となるように 5% human 血清を含む RPMI (以下 5 H RPMI と省略) で段階希釈後、96 穴細胞培養プレートの各ウェルに 100  $\mu$ L / ウェルずつ分注しておき、これらに  $1 \times 10^5$  cells/mL に調製した Calcein 標識標的細胞を 100  $\mu$ L / ウェルずつ添加した。上記細胞懸濁液の入ったプレートを  $400 \times g$  で 1 分間遠心後、37°C の湿式 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 時間インキュベートした。4 時間後、各ウェルから培養上清 100  $\mu$ L を採取し、蛍光プレートリーダー (485 nm / 538 nm) によって培養上清中に放出された calcein 量 (蛍光強度) を測定した。LAK 細胞の細胞傷害活性は以下の式 1 にしたがって算出した。

式 1 :

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = [( \text{各ウェルの測定値} - \text{最小放出量} ) / ( \text{最大放出量} - \text{最小放出量} )] \times 100$$

上式において最小放出量は標的細胞のみ含有するウェルの calcein 放出量であり、標的細胞からの calcein 自然放出量を示す。また、最大放出量は標的細胞に界面活性剤である Triton X-100 (ナカライトスク社製) を終濃度 0.05% となるように加えて細胞を完全破壊した際の calcein 放出量を示している。結果を表 25 に示す。なお、表中、「E/T」とはエフェクター細胞と標的細胞の細胞数に基づく比 (エフェクター細胞 / 標的細胞) を表す。

表25

血清濃度 ・培地	フィブロネクチン フラグメント	E/T	細胞傷害活性 (%) (標的細胞 K562)	細胞傷害活性 (%) (標的細胞 Daudi)
0%XVIV020	対照 (FNfr 非固定化)	20	28.7	13.3
0%XVIV020	CH-296	20	46.7	23.8
0%XVIV020	H-296	20	49.9	19.0
0.2%XVIV020	対照 (FNfr 非固定化)	10	13.3	11.6
0.2%XVIV020	CH-296	10	18.2	18.6
1%XVIV020	対照 (FNfr 非固定化)	20	36.5	24.8
1%XVIV020	H-296	20	62.8	39.0
5%XVIV020	対照 (FNfr 非固定化)	30	57.0	56.6
5%XVIV020	CH-296	30	78.1	59.1
0%AIM V	対照 (FNfr 非固定化)	30	25.2	23.4
0%AIM V	CH-296	30	36.8	28.1
5%AIM V	対照 (FNfr 非固定化)	30	55.3	49.8
5%AIM V	CH-296	30	77.2	53.6
5%AIM V	対照 (FNfr 非固定化)	10	35.1	50.5
5%AIM V	CH-296	10	71.6	51.8
5%AIM V	H-296	10	73.9	57.8
5%XVIV010	対照 (FNfr 非固定化)	10	72.6	51.1
5%XVIV010	CH-296	10	84.6	57.4
5%XVIV010	H-296	10	89.3	69.5

表25に示されるように、血清を含まない培地もしく低濃度の血清を含んだ培地を用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の細胞傷害活性が高い。またこの効果は基本培地を変えて発揮された。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を含まない培地または低濃度の血清を含んだ培地を用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

#### 実施例26 低血清培地 (AIM V) を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定 (繰り返し刺激による拡大培養) - 1

##### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用す

る培地を1% human AB血清を含む培地AIM-Vに変更した。結果を表2-6に示す。

表2-6

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	拡大培養率 (倍率)
1%AIM V	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	×130
1%AIM V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	×2419

表2-6に示されるように、低濃度の血清(1%)を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗CD3抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわちLAK細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗CD3抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例2-7 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(繰り返し刺激による拡大培養) - 2

##### (1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(容器)に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち12穴細胞培養プレートまたは12.5cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコ(Falcon社製)に抗ヒトCD3抗体(終濃度5μg/mL)を含むPBSを1.9mL(12穴プレートの場合)または2mL(12.5cm<sup>2</sup>フラスコの場合)ずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造

例1に記載の各フィブロネクチンフラグメント(FNfr)を終濃度10μg/mL(12穴プレートの場合)または25μg/mL(12.5cm<sup>2</sup>フラスコの場合)となるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、AIM-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

#### (2) LAK細胞の誘導および培養

1%AIM-Vに5×10<sup>5</sup>cells/mLとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例27-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化プレートに1mL/ウェルずつまき、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO<sub>2</sub>中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後2、3日目には1000U/mLのIL-2を含む1%AIM-Vを1mL/ウェルずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない25cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコ(Falcon社製)に移し、さらに1%AIM-V7mLを添加し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始7日目には1%AIM-Vを用いて細胞濃度を2×10<sup>5</sup>cells/mLに調整した培養液の一部を何も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始9日目には実施例27-(1)と同様の方法で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコ(ただし、固定化に用いる抗ヒトCD3抗体の濃度は0.5μg/mLとした)に1%AIM-Vを用いて細胞濃度を2×10<sup>5</sup>cells/mLに調整した培養液の一部を移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始12日目に再度適宜1%AIM-Vを用いて細胞濃度を2×10<sup>5</sup>cells/mLに調整した培養液の一部を何

も固定化していない新しいフラスコに移し、終濃度 500 U/mL となるよう I L-2 を添加した。培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。同条件にて n = 3 で拡大培養を行い、その平均±標準偏差の各結果を表 27 に示す。

表 27

血清濃度 ・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	拡大培養率 (倍率)
1% AIM V	対照 (FNf r 非固定化)	抗CD3	なし	× 3392 ± 779
1% AIM V	FNf r 非固定化	抗CD3	抗CD3	× 4389 ± 1234
1% AIM V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	× 8545 ± 1328
				平均値±標準偏差

表 27 に示されるように、低濃度の血清 (1%) を含んだ AIM V 培地を用いての LAK 細胞誘導時初期および中期に繰り返し各フィブロネクチンフラグメントおよび抗 CD3 抗体を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して LAK 細胞の拡大培養率が高い。これらの拡大培養率は、LAK 細胞誘導時初期および中期に繰り返し抗 CD3 抗体のみを固定化した培養器材を使用した群における拡大培養率よりもはるかに高いものであった。すなわち LAK 細胞誘導初期および中期にフィブロネクチンフラグメントおよび抗 CD3 抗体を用いて刺激することにより、低濃度の血清を含んだ培地を用いた場合でも高い拡大培養率で LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例 28 無血清培地 (AIM V) を用いた LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率 (繰り返し刺激による拡大培養)

##### (1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 2-(1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を human AB 血清を含まない AIM V に変更した。

##### (2) LAK 細胞における CD8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4－(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表28に示す。

表28

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	CD8陽性細胞 含有率(%)
0%AIM V	対照(FNfr非固定化)	抗CD3	なし	43.8
0%AIM V	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	64.4
0%AIM V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	76.6

表28に示されるように、血清を含まないAIM V培地を用いてのLAK細胞誘導初期または中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞後細胞集団におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、LAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例29 低血清培地(AIM V)を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率(繰り返し刺激による拡大培養)

##### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2－(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1%human AB血清を含むAIM Vに変更した。

##### (2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4－(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表29に示す。

表 2 9

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	CD 8 陽性細胞 含有率 (%)
1 %AIM V	対照 (FNfr 非固定化)	抗CD3	なし	39.2
1 %AIM V	対照 (FNfr 非固定化)	抗CD3	抗CD3	60.0
1 %AIM V	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	49.2
1 %AIM V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	71.0

表 2 9 に示されるように、低濃度の血清を含んだ AIM V 培地を用いての LAK 細胞誘導初期または初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養後の LAK 細胞集団における CD 8 陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いて LAK 細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、 LAK 細胞中の CD 8 陽性細胞の含有率を高くしながら LAK 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

### 実施例 3 0 無血清培地 (AIM V) を用いた LAK 細胞培養系における IL-2 レセプター (IL-2R) 発現の誘導

#### (1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 2-(1) と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を human AB 血清を含まない AIM V 培地に変更した。

#### (2) LAK 細胞における IL-2R 発現率の測定

実施例 3-(2) と同様の方法で、 IL-2R 発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表 3 0 に示す。かかる表では IL-2R 発現陽性細胞含有率 (%) を IL-2R 発現率 (%) と表示する。

表30

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始0日 目刺激	培養開始9日 目刺激	I L - 2 R 発現率 (%)
0%AIM V	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	22.0
0%AIM V	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	39.9
0%AIM V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	51.9

表30に示されるように、血清を含まないAIM V培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養後のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち血清を含まない培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

### 実施例31 低血清培地 (AIM V) を用いたLAK細胞培養系におけるIL-2レセプター (IL-2R) 発現の誘導(繰り返し刺激による拡大培養)

#### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例2-(1)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1%human AB血清を含むAIM V培地に変更した。

#### (2) LAK細胞におけるIL-2R発現率の測定

実施例3-(2)と同様の方法で、IL-2R発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表31に示す。かかる表ではIL-2R発現陽性細胞含有率(%)をIL-2R発現率(%)と表示する。

表3 1

血清濃度 ・培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日 目刺激	培養開始 9 日 目刺激	I L - 2 R 発現率 (%)
1%AIM V	対照 (FNfr 非固定化)	抗CD3	なし	23.6
1%AIM V	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	27.2
1%AIM V	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	69.1

表3 1に示されるように、低濃度の血清を含んだAIM V培地を用いてのLAK細胞誘導初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のLAK細胞表面上におけるIL-2R発現率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いてLAK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、IL-2R発現率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

### 実施例3 2 低血清培地 (AIM V) を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率

#### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を1%human AB血清を含むAIM V培地に変更した。

#### (2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表3 2に示す。

表3 2

血清濃度・培地	フィブロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率 (%)
1%AIM V	対照 (FNfr 非固定化)	41.02
1%AIM V	CH-296	56.78

表32に示されるように、低血清を含むA IM V培地を用いてのL AK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中のL AK細胞中におけるCD 8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含む培地を用いてL AK細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、L AK細胞中のCD 8陽性細胞の含有率を高くしながらL AK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

### 実施例33 無血清・低血清培地を用いたL AK細胞培養系における細胞傷害活性の測定

#### (1) L AK細胞の誘導および培養

実施例1-(3)または実施例2-(1)と同様の方法でL AK細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を0%または1%human AB血清を含むX VIVO 10、X VIVO 20またはA IM V培地に変更した。

#### (2) 培養したL AK細胞の細胞傷害活性の測定

実施例25-(2)と同様の方法で培養後15日目のL AKの細胞傷害活性を測定した。結果を表33に示す。

表 3 3

血清濃度・ 培地	フィブロネクチン フラグメント	培養開始 0 日目刺激	培養開始 9 日目刺激	E/T	細胞傷害 活性(%) 標的細胞 K562	細胞傷害 活性(%) 標的細胞 Daudi
0%XVIV010	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	10	11.88	10.84
0%XVIV010	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	10	19.55	26.23
1%AIM V	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	なし	10	16.82	33.02
1%AIM V	CH-296	抗CD3+CH-296	なし	10	46.54	42.3
0%XVIV020	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	10	24.5	13.3
0%XVIV020	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	10	30.8	23.3
1%XVIV020	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	10	18.5	13.9
1%XVIV020	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	10	30.8	28.5
1%XVIV010	対照 (FNfr非固定化)	抗CD3	抗CD3	10	13.8	8.4
1%XVIV010	CH-296	抗CD3+CH-296	抗CD3+CH-296	10	33.0	31.8

表 3 3 に示されるように、血清を含まない培地もしくは低濃度の血清を含んだ培地を用いての LAK 細胞誘導初期または初期および中期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して LAK 細胞の細胞傷害活性が高い。またこの効果は基本培地を変えても発揮された。このことから各フィブロネクチンフラグメントは血清を含まない培地または低濃度の血清を含んだ培地を用いた LAK 細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例 3 4 低血清培地 (XVIV010) を用いた LAK 細胞培養系における拡大培養率の測定 (細胞培養用 CO<sub>2</sub> ガス透過性バッグを用いた培養)

#### (1) 抗ヒト CD 3 抗体および FN フラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材 (細胞培養用 CO<sub>2</sub> ガス透過性バッグ) に抗ヒト CD 3 抗体および FN フラグメントを固定化した。すなわち 85 cm<sup>2</sup> 細胞培

養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグ（B a x t e r 社製）に抗ヒトCD3抗体（終濃度5 μg/mL）を含むPBSを20mLずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載の各フィプロネクチンフラグメント（FNfr）を終濃度42.5 μg/mLとなるように添加した。対照として、FNfrを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各バッグをPBSで2回、1%humanAB血清を含むXVIVO10培地（以下1%XVIVO10と略す）で1回洗浄し各実験に供した。

#### （2）LAK細胞の誘導および培養

1%XVIVO10に1×10<sup>6</sup> cells/mLとなるように実施例1-（1）で調製したPBMCを懸濁後、実施例34-（1）で調製した抗ヒトCD3抗体固定化細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグに10mL/バッグずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらの細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを5%CO<sub>2</sub>中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後2日目には1000U/mLのIL-2を含む1%XVIVO10を20mL/バッグずつ添加した。培養開始4日目には終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始後6日目には1%XVIVO10を30mL/バッグずつ添加し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釀した後、何も固定化していない85cm<sup>2</sup>細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグに移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表34に示す。

表 3 4

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率（倍率）
1% X V I V O 1 0	1 5 日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 3 4
1% X V I V O 1 0	1 5 日間	C H - 2 9 6	× 1 0 1

表 3 4 に示されるように、低濃度（1%）の血清を含んだ培地（X V I V O 1 0）と細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地および細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例 3 5 低血清培地（X V I V O 1 0）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせた培養）

#### （1）抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材（25cm<sup>2</sup> 細胞培養用フラスコ）に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち25cm<sup>2</sup> 細胞培養用フラスコ（コーニング社製）に抗ヒトCD3抗体（終濃度5μg/mL）を含むPBSを6mLずつ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載の各フィブロネクチンフラグメント（F N f r）を終濃度42.5μg/mLとなるように添加した。対照として、F N f rを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4℃で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・F N f rを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、1% human AB血清を含むX V I V O 1 0 培地（以下1% X V I V O 1 0と略す）で1回洗浄し各実験に供した。

## (2) LAK細胞の誘導および培養

1%XVIVO10に $1 \times 10^6$  cells/mLとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例35-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3mL/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO<sub>2</sub>中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後1日目または2日目には1000U/mLのIL-2を含む1%XVIVO10を7mL/フラスコずつ添加した。以下抗CD3抗体±CH-296刺激期間により2つの方法で培養した。（i）培養開始後4日に培養液をなにも固定化していない85cm<sup>2</sup>細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグに移した後、1%XVIVO10を20mL/バッグずつ添加し終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加、さらに培養開始後6日に1%XVIVO10を30mL/バッグずつ添加後、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した（抗CD3抗体±CH-296刺激期間4日間）。（ii）培養開始4日目または5日に終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加し、培養開始後6日に培養液をなにも固定化していない85cm<sup>2</sup>細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグに移した後、1%XVIVO10を50mL/バッグずつ添加、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した（抗CD3抗体±CH-296刺激期間6日間）。両条件とも培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釀した後、何も固定化していない85cm<sup>2</sup>細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグに移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始15日にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表35に示す。

表35

血清濃度・培地	抗CD3±CH-296 刺激期間	培養日数	フィプロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
1% X V I V O 1 0	4日間	15日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 2 3 5
1% X V I V O 1 0	4日間	15日間	CH-296	× 4 9 8
1% X V I V O 1 0	6日間	15日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 4 2 5
1% X V I V O 1 0	6日間	15日間	CH-296	× 6 9 0

表35に示されるように、低濃度（1%）の血清を含んだ培地（X V I V O 1 0）を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例36 低血清培地（A I M V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせた培養）

（1）抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材（25cm<sup>2</sup>細胞培養用フラスコ）に実施例35-（1）と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・F N f r を含むP B S を除去後、各フラスコをP B Sで2回、1% human A B 血清を含むA I M V培地（以下1% A I M Vと略す）で1回洗浄し各実験に供した。

（2）LAK細胞の誘導および培養

1% A I M Vに1×10<sup>6</sup> cells/mLとなるように実施例1-（1）

で調製したP B M Cを懸濁後、実施例3 6 – (1)で調製した抗ヒトC D 3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトC D 3抗体およびF N f r固定化フラスコに3mL／フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1 0 0 0 U／mLとなるようにI L – 2を添加した。これらのフラスコを5%CO<sub>2</sub>中37℃で培養した（培養0日目）。培養開始後1日目には1 0 0 0 U／mLのI L – 2を含む1%A I M Vを7mL／フラスコずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない85cm<sup>2</sup>細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグに移した後、1%A I M Vを20mL／バッグずつ添加し、終濃度5 0 0 U／mLとなるようI L – 2を添加した。培養開始6日目には1%A I M Vを30mL／バッグずつ添加し、終濃度5 0 0 U／mLとなるようI L – 2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釀した後、何も固定化していない85cm<sup>2</sup>細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグに移し、終濃度5 0 0 U／mLとなるようI L – 2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度5 0 0 U／mLとなるようI L – 2を添加した。培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表3 6に示す。

表3 6

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	拡大培養率（倍率）
1%A I M V	1 5 日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 3 2 7
1%A I M V	1 5 日間	CH – 2 9 6	× 5 6 6

表3 6に示されるように、低濃度(1%)の血清を含んだ培地(A I M V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたL A K細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較してL A K細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バ

ッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例37 低血清培地（XVIVO10）を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率（細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを用いた培養）

（1）LAK細胞の誘導および培養

実施例34-（2）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

（2）LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-（2）と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表37に示す。

表37

血清濃度・培地	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	CD8陽性細胞含有率（%）
1%XVIVO10	15日間	対照（FNfr非固定化）	45.7
1%XVIVO10	15日間	CH-296	61.6

表37に示されるように、低濃度（1%）の血清を含んだ培地（XVIVO10）と細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを用いてのLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを使用した群においては、培養後のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地および細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを用いたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例38 低血清培地（XVIVO10）を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率（細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせた培養）

## (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例35-（2）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

## (2) LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-（2）と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表38に示す。

表38

血清濃度・培地	抗CD3±CH-296 刺激期間	培養日数	フィブロネクチン フラグメント	CD8陽性 細胞含有率 (%)
1% X V I V O 1 0	4日間	15日間	対照 (FNfr非固定化)	58.1
1% X V I V O 1 0	4日間	15日間	CH-296	70.3
1% X V I V O 1 0	6日間	15日間	対照 (FNfr非固定化)	58.3
1% X V I V O 1 0	6日間	15日間	CH-296	72.7

表38に示されるように、低濃度(1%)の血清を含んだ培地(XVIVO10)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較して培養後のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

## 実施例39 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(培養開始時、継代時の濃度)

LAK細胞培養系における培養開始時および継代時の細胞濃度が拡大培養率に及ぼす影響を確認した。

培養開始時の細胞濃度として0.5×10<sup>6</sup> cells/mLおよび1×10<sup>6</sup> cells/mLを設定した。培養4日目の継代細胞濃度として、0.025

$\times 10^6$  cells/mL および  $0.05 \times 10^6$  cells/mL を設定した。培養 7、9 および 11 日目の継代細胞濃度として、 $0.2 \times 10^6$  cells/mL および  $0.5 \times 10^6$  cells/mL を設定した。下記表 39-1 に上記パターンを示す。

表 39-1

	培養開始時濃度	培養 4 日目濃度	培養 7、9、11 日目濃度
細胞濃度パターン 1	0.500	0.025	0.2
細胞濃度パターン 2	0.500	0.05	0.2
細胞濃度パターン 3	0.500	0.05	0.5
細胞濃度パターン 4	1.000	0.025	0.2
細胞濃度パターン 5	1.000	0.05	0.2
細胞濃度パターン 6	1.000	0.05	0.5

\* 細胞濃度 ( $\times 10^6$  cells/mL)

### (1) 抗ヒト CD 3 抗体および FN フラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒト CD 3 抗体および FN フラグメントを固定化した。すなわち 24 穴細胞培養プレートに抗ヒト CD 3 抗体（終濃度 5  $\mu$ g/mL）を含む PBS を 1 mL ずつ添加した。この時、FN フラグメント添加群には製造例 1 に記載のフィブロネクチンフラグメント（CH-296）を終濃度 25  $\mu$ g/mL となるように添加した。対照として、CH-296 を添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で 5 時間インキュベート後、使用時まで 4°C で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗ヒト CD 3 抗体・CH-296 を含む PBS を吸引除去後、各ウェルを PBS で 2 回、RPMI 培地で 1 回洗浄し各実験に供した。

### (2) LAK 細胞の誘導および培養

1 % の human AB 血清を含む AIM-V に細胞濃度パターン 1、2 および 3 で培養する区分は  $0.5 \times 10^6$  cells/mL となるように、細胞濃度パターン 4、5 および 6 で培養する区分は  $1 \times 10^6$  cells/mL となるよう

に実施例 1 - (1) で調製した P B M C を懸濁後、(1) で調製した抗ヒト C D 3 抗体固定化プレート、または抗ヒト C D 3 抗体および C H - 2 9 6 固定化プレートに 1 m L / ウェルずつまき、終濃度 1 0 0 0 U / m L となるように I L - 2 を添加した。これらのプレートを 5 % C O <sub>2</sub> 中 3 7 ℃ で培養した (培養 0 日目)。培養開始後 2、3 日目には 1 0 0 0 U / m L の I L - 2 を含む 1 % A I M - V を 1 m L / ウェルずつ添加した。

培養開始後 4 日目に細胞濃度パターン 1 および 4 で培養する区分は、0. 0 2 5 × 1 0 <sup>6</sup> c e l l s / m L となるように、また細胞濃度パターン 2、3、5、6 で培養する区分は、0. 0 5 × 1 0 <sup>6</sup> c e l l s / m L となるように 1 % h u m a n A B 血清を含む A I M - V により希釀し (液量最大 6 m L) 、何も固定化していない 1 2. 5 c m <sup>2</sup> 細胞培養フラスコにそれぞれ移した。各区分において終濃度 5 0 0 U / m L となるよう I L - 2 を添加した。

培養開始後 7、9 および 1 1 日目には細胞濃度パターン 1、2、4 および 5 で培養する区分は、0. 2 × 1 0 <sup>6</sup> c e l l s / m L となるように、また細胞濃度パターン 3、6 で培養する区分は、0. 5 × 1 0 <sup>6</sup> c e l l s / m L となるように 1 % h u m a n A B 血清を含む A I M - V により希釀し (液量最大 6 m L) 、何も固定化していない 1 2. 5 c m <sup>2</sup> 細胞培養フラスコにそれぞれ移した。各区分において終濃度 5 0 0 U / m L となるよう I L - 2 を添加した。

培養開始 1 5 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は 3 連で行った。その平均の各結果を表 3 9 - 2 に示す。

表 39-2

	培養開始 0 日目刺激	拡大培養率 (倍率)
細胞濃度パターン 1	抗 CD 3	1 4 2 7
	抗 CD 3 + CH-296	2 6 4 9
細胞濃度パターン 2	抗 CD 3	3 4 0 1
	抗 CD 3 + CH-296	3 6 9 1
細胞濃度パターン 3	抗 CD 3	7 4 9
	抗 CD 3 + CH-296	2 5 0 8
細胞濃度パターン 4	抗 CD 3	2 5 6
	抗 CD 3 + CH-296	4 3 6
細胞濃度パターン 5	抗 CD 3	1 0 9 1
	抗 CD 3 + CH-296	1 1 7 9
細胞濃度パターン 6	抗 CD 3 + CH-296	4 7 6

表 39-2 に示されるように、培養開始時および継代時において種々の細胞濃度での LAK 細胞培養において、いずれの細胞濃度区分においても、対照群（抗 CD 3 抗体のみによる刺激）と比較して CH-296 および抗 CD 3 抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、諸状況下で変化しうる培養開始時および継代時の細胞濃度に対して、CH-296 により刺激することにより、明らかに高い拡大培養率で LAK 細胞を誘導・培養できることが示された。

実施例 40 低血清培地 (AIM-V) を用いて培養した LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率（培養開始時、継代時の濃度）

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 39 と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。

(2) LAK 細胞における CD8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4-(2) と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 40 に示す。

表40

	培養開始0日目刺激	CD8陽性細胞含有率(%)
細胞濃度パターン1	抗CD3	55
	抗CD3+CH-296	63
細胞濃度パターン2	抗CD3	62
	抗CD3+CH-296	73
細胞濃度パターン3	抗CD3	71
	抗CD3+CH-296	75
細胞濃度パターン4	抗CD3	56
	抗CD3+CH-296	70
細胞濃度パターン5	抗CD3	61
	抗CD3+CH-296	70
細胞濃度パターン6	抗CD3+CH-296	76

表40に示されるように、培養開始時および継代時において種々の細胞濃度でのLAK細胞培養において、いずれの細胞濃度区分においても、対照群（抗CD3抗体のみによる刺激）と比較してCH-296および抗CD3抗体により刺激した群において培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち、諸状況下で変化しうる培養開始時および継代時の細胞濃度に対して、CH-296により刺激することにより、明らかにLAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例41 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（高濃度・高密度培養）

LAK細胞培養系において、最終培養液量および最終培養面積を極力抑えることができれば、培地、資材および労力を低減することができる。細胞を高濃度、高密度で培養したときの拡大培養率に及ぼす影響を確認した。

継代時の細胞濃度および細胞密度を抑えない区分（普通培養区分）、培養7および10日目の継代時の細胞濃度を普通培養区分のそれぞれ1.8倍および約6倍にした区分（高濃度培養区分、ただし細胞密度は濃度に比例して同じく1.8

倍および約 6 倍となる)、培養 7 および 10 日目の継代時の細胞濃度を普通培養区分のそれぞれ 1.3 倍および約 2.5 倍に、かつ細胞密度をそれぞれ約 3.9 倍および 7.5 倍にした区分(高濃度・高密度培養区分)を設定した。下記表 4-1 に上記各群での継代時細胞濃度および細胞密度を示す。

表 4-1-1

		培養 0 日目	培養 4 日目	培養 7 日目	培養 10 日目
普通培養区分	細胞濃度( $\times 10^6$ c e 1 l s / mL)	0.333	0.050	0.100	0.15
	細胞密度( $\times 10^6$ c e 1 l s / cm <sup>2</sup> )	0.263	0.024	0.048	0.072
高濃度培養区分	細胞濃度( $\times 10^6$ c e 1 l s / mL)	0.333	0.050	0.180	0.893
	細胞密度( $\times 10^6$ c e 1 l s / cm <sup>2</sup> )	0.263	0.024	0.086	0.429
高濃度・高密度培養区分	細胞濃度( $\times 10^6$ c e 1 l s / mL)	0.333	0.050	0.13	0.38
	細胞密度( $\times 10^6$ c e 1 l s / cm <sup>2</sup> )	0.263	0.024	0.186	0.543

#### (1) 抗ヒト CD 3 抗体および FN フラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒト CD 3 抗体および FN フラグメントを固定化した。すなわち 12 穴細胞培養プレートに抗ヒト CD 3 抗体(終濃度 5  $\mu$  g / mL)を含む PBS を 1.9 mL ずつ添加した。この時、FN フラグメント添加群には製造例 1 に記載のフィブロネクチンフラグメント(CH-296)を終濃度 2.5  $\mu$  g / mL となるように添加した。対照として、CH-296 を添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で 5 時間インキュベート後、使用時まで 4 °C で保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗ヒト CD 3 抗体・CH-296 を含む PBS を吸引除去後、各ウェルを PBS で 2 回、RPMI 培地で 1 回洗浄し各実験に供した。

#### (2) LAK 細胞の誘導および培養

各培養区分とも 1 % の human AB 血清を含む AIM-V に  $0.33 \times 10^6$  cells/mL となるように、実施例 1-(1) で調製した PBMC を懸濁後、実施例 41-(1) で調製した抗ヒト CD3 抗体固定化プレート、または抗ヒト CD3 抗体および CH-296 固定化プレートに 3 mL/ウェルずつまき、終濃度 1000 U/mL となるように IL-2 を添加した。これらのプレートを 5 % CO<sub>2</sub> 中 37 °C で培養した（培養 0 日目）。

培養開始後 4 日目に各培養区分とも、 $0.05 \times 10^6$  cells/mL となるように 1 % human AB 血清を含む AIM-V により希釈し（液量最大 6 mL）、何も固定化していない 12.5 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始後 7 日目には、普通培養区分は  $0.1 \times 10^6$  cells/mL となるように、高濃度培養区分は  $0.18 \times 10^6$  cells/mL となるように 1 % human AB 血清を含む AIM-V により希釈し（液量最大 6 mL）、何も固定化していない 12.5 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコに移した。また、高濃度・高密度培養区分は  $0.13 \times 10^6$  cells/mL となるように 1 % human AB 血清を含む AIM-V により希釈し（液量最大 9 mL）、何も固定化していない 25 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコを立てたものに移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始後 10 日目には、普通培養区分は  $0.15 \times 10^6$  cells/mL となるように、高濃度培養区分は  $0.893 \times 10^6$  cells/mL となるように 1 % human AB 血清を含む AIM-V により希釈し（液量最大 6 mL）、何も固定化していない 12.5 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコに移した。また、高濃度・高密度培養区分は  $0.38 \times 10^6$  cells/mL となるように 1 % human AB 血清を含む AIM-V により希釈し（液量最大 9 mL）、何も固定化していない 25 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコを立てたものに移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始後 11 日目には各区分に終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は 2 連で行った。その平均の各結果を表 4-2 に示す。

表 4-2

	培養開始 0 日目刺激	拡大培養率 (倍率)
普通培養区分	抗 CD 3	601
	抗 CD 3 + CH-296	2325
高濃度培養区分	抗 CD 3	112
	抗 CD 3 + CH-296	1131
高濃度・高密度培養区分	抗 CD 3	215
	抗 CD 3 + CH-296	1307

表 4-2 に示されるように、普通培養区分あるいは高濃度培養区分あるいは高濃度・高密度培養区分において、いずれの区分においても、対照群（抗 CD 3 抗体のみによる刺激）と比較して CH-296 および抗 CD 3 抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、培地、資材および労力を低減することができる高濃度・高密度培養において CH-296 による刺激により明らかに拡大培養に対する効果が認められた。

実施例 4-2 低血清培地 (AIM-V) を用いて培養した LAK 細胞集団中における CD8 陽性細胞含有比率 (高濃度、高密度培養)

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 4-1 と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。

(2) LAK 細胞における CD8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4-2 と同様の方法で CD8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 4-2 に示す。

表42

	培養開始0日目刺激	CD8陽性細胞含有率(%)
普通培養区分	抗CD3	5.3
	抗CD3+CH-296	6.3
高濃度培養区分	抗CD3	5.5
	抗CD3+CH-296	7.2
高濃度・高密度培養区分	抗CD3	6.3
	抗CD3+CH-296	6.5

表42に示されるように、普通培養区分あるいは高濃度培養区分あるいは高濃度・高密度培養区分において、いずれの区分においても、対照群（抗CD3抗体のみによる刺激）と比較してCH-296および抗CD3抗体により刺激した群において培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち、培地、資材および労力を低減することができる高濃度・高密度培養においてCH-296による刺激により、明らかにLAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例43 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（血清濃度0%、0.15%、5%→0.1%）

LAK細胞培養において1回に30mLを採血すると、大体15mLの血漿が得られる。これを最終10Lまでの培地により培養することを考慮すると、血漿濃度として0.15%となる。また、5%の血漿濃度から培養を開始すると4日目以降、細胞を継代、希釈するときの培地における血漿濃度は0.1%程度となる。以上を鑑みてLAK細胞培養系における血清濃度の影響を確認した。

培養開始時にhumanAB血清が0%、0.15%あるいは5%それぞれ含まれる区分を設定した。各濃度のhumanAB血清を含むAIM-Vに $0.3 \times 10^6$  cells/mLとなるように実施例1-(1)で調製したPBMC

を懸濁後、実施例41-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH-296固定化プレートに3mL/ウェルずつまき、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO<sub>2</sub>中37℃で培養した(培養0日目)。

培養開始後4日目に0%、0.15%humanAB血清を含むAIM-Vで培養した区分は、最大 $0.05 \times 10^6$  cells/mLとなるように、それぞれ0%あるいは0.15%humanAB血清を含むAIM-Vにより希釈し、何も固定化していない12.5cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコに培養液を移した(液量2.5mL)。5%humanAB血清を含むAIM-Vで培養した区分は、0.05 $\times 10^6$  cells/mLとなるように0.1%humanAB血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量6mL)、何も固定化していない12.5cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始7日目には0%、0.15%humanAB血清を含むAIM-Vで培養した区分はそれぞれ同濃度の血清を含むAIM-Vにより $0.11 \times 10^6$  cells/mLとなるように希釈し、何も固定化していない新しい25cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコを立てたものに移した(液量最大12.6mL)。5%humanAB血清を含むAIM-Vで培養した区分は、0.1%humanAB血清を含むAIM-Vにより $0.11 \times 10^6$  cells/mLとなるように希釈し、何も固定化していない新しい25cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコを立てたものに移した(液量最大12.6mL)。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始10日目には0%、0.15%humanAB血清を含むAIM-Vで培養した区分はそれぞれ同濃度の血清を含むAIM-Vにより $0.22 \times 10^6$  cells/mLとなるように希釈し、何も固定化していない新しい25cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコを立てたものに移した(液量最大12.6mL)。5%hu

manAB血清を含むAIM-Vで培養した区分は、0.1%humanAB血清を含むAIM-Vにより $0.6 \times 10^6$  cells/mLとなるように希釈し、何も固定化していない新しい $25\text{ cm}^2$ 細胞培養フラスコを立てたものに移した（液量最大12.6mL）。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は2連で行った。その平均の各結果を表43に示す。

表43

血清濃度・培地	培養開始0日目刺激	拡大培養率（倍率）
0%AIM-V	抗CD3	25
	抗CD3+CH-296	322
0.15%AIM-V	抗CD3	42
	抗CD3+CH-296	197
5%→0.1%AIM-V	抗CD3	175
	抗CD3+CH-296	353

表43に示されるように、各血清濃度を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞培養において、いずれの血清濃度区分においても、対照群（抗CD3抗体のみによる刺激）と比較してCH-296および抗CD3抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、30mL採血を想定した血清濃度におけるLAK細胞培養において、CH-296および抗CD3抗体により刺激することで、明らかに高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養における細胞は高濃度・高密度であり、CH-296で刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH-296の有効性が認められた。

実施例44 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大

培養率の測定（血清濃度 3 %→1 %→0 %→0 %、 3 %→1 %→0. 1 %→0 %、 3 %→0. 5 %→0. 2 %→0. 2 %（最終培養液量約半量）、 3 %→0. 5 %→0. 2 %→0. 05 %）

実施例 4-3 と同様の観点で 30 mL 採血により得られる血漿濃度を考慮して LAK 細胞培養系における血清濃度の影響を確認した。

human AB 血清濃度は培養開始時は 3 %で、培養 4 日目に 1 %あるいは 0. 5 % human AB 血清を含む AIM-V 培地で細胞を希釈する群、培養 7 日目に 0 %、 0. 1 %あるいは 0. 2 % human AB 血清を含む AIM-V 培地で細胞を希釈する群、培養 10 日目に 0 %、 0. 05 %あるいは 0. 2 % human AB 血清を含む AIM-V 培地で細胞を希釈する群をそれぞれ設定した。下記表 4-4-1 に上記パターンを示す。

表 4-4-1

	培養開始 4 日目	培養開始 7 日目	培養開始 10 日目
血清濃度パターン 1	1 %	0 %	0 %
血清濃度パターン 2	1 %	0. 1 %	0 %
血清濃度パターン 3	0. 5 %	0. 2 %	0. 2 %
血清濃度パターン 4	0. 5 %	0. 2 %	0. 05 %

\* 細胞培養液を希釈する培地に含まれる human AB 血清濃度を示す

3 %の human AB 血清を含む AIM-V に  $0.33 \times 10^6$  cells/mL となるように実施例 1-(1) で調製した PBMC を懸濁後、実施例 4-1-(1) で調製した抗ヒト CD3 抗体固定化プレート、または抗ヒト CD3 抗体および CH-296 固定化プレートに 3 mL/ウェルずつまき、終濃度 1000 U/mL となるように IL-2 を添加した。これらのプレートを 5 % CO<sub>2</sub> 中 37 °C で培養した（培養 0 日目）。

培養開始後 4 日目に血清濃度パターン 1 および 2 で培養する区分は、 0. 05  $\times 10^6$  cells/mL となるように 1 % human AB 血清を含む AIM-V により希釈し（液量 6 mL）、何も固定化していない 12. 5 cm<sup>2</sup> 細胞培養

フラスコに移した。血清濃度パターン3および4で培養する区分は、0. 058  $\times 10^6$  cells/mLとなるように0. 5% human AB血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量6mL）、何も固定化していない12. 5cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始7日目には血清濃度パターン1で培養する区分は、0. 28  $\times 10^6$  cells/mLとなるようにhuman AB血清を含まないAIM-Vにより希釈し（液量12. 6mL）、また血清濃度パターン2で培養する区分は、0. 28  $\times 10^6$  cells/mLとなるように0. 1% human AB血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量12. 6mL）、何も固定化していない新しい25cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。血清濃度パターン3および4で培養する区分は、0. 48  $\times 10^6$  cells/mLとなるように0. 2% human AB血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量12. 6mL）、何も固定化していない新しい25cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコを立てたものに移した。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始10日目には血清濃度パターン1および2で培養する区分は、0. 51  $\times 10^6$  cells/mLとなるようにhuman AB血清を含まないAIM-Vにより希釈し（液量12. 6mL）、何も固定化していない新しい25cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコを立てたものに移した。血清濃度パターン3で培養する区分は、0. 839  $\times 10^6$  cells/mLとなるように0. 2% human AB血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量12. 6mL）、また血清濃度パターン4で培養する区分は、0. 43  $\times 10^6$  cells/mLとなるように0. 05% human AB血清を含むAIM-Vにより希釈し（液量12. 6mL）、何も固定化していない新しい25cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始15日にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時

の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は2連で行った。その平均の各結果を表44-2に示す。

表44-2

	培養開始0日目刺激	拡大培養率(倍率)
血清濃度パターン1	抗CD3	182
	抗CD3+CH-296	425
血清濃度パターン2	抗CD3	195
	抗CD3+CH-296	430
血清濃度パターン3(最終培養液量半量)	抗CD3	101
	抗CD3+CH-296	242
血清濃度パターン4	抗CD3	190
	抗CD3+CH-296	416

表44-2に示されるように、各血清濃度を含んだAIM-V培地を用いてのLAK細胞培養において、いずれの血清濃度区分においても、対照群(抗CD3抗体のみによる刺激)と比較してCH-296および抗CD3抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、30mL採血を想定した血清濃度におけるLAK細胞培養において、CH-296および抗CD3抗体により刺激することで、抗CD3抗体単独で刺激するよりも、明らかに高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養における細胞は高濃度・高密度であり、CH-296で刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH-296の有効性が認められた。

実施例45 低血清培地(AIM-V)を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

#### (1) LAK細胞の誘導および培養

実施例36-(2)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。結果を表4

5に示す。

表45

血清濃度・培地	抗CD3±CH-296 刺激期間	培養日数	フィプロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
1% AIM V	4日間	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×327
1% AIM V	4日間	15日間	CH-296	×566
1% AIM V	6日間	15日間	対照 (FNfr非固定化)	×371
1% AIM V	6日間	15日間	CH-296	×425

表45に示されるように、低濃度(1%)の血清を含んだ培地(AIM V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較してLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血清を含んだ培地を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例46 新鮮分離PBM Cおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(0.5%自己血漿を含むAIM V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

#### (1) PBM Cの分離および保存

インフォームド・コンセントの得られたヒト健常人ドナーより採血用注射筒にて30mL採血を実施後、採血液を500×g 20分間遠心し、自己血漿およびバフィーコート層を回収した。回収したバフィーコート層はPBSで希釀後Ficol 1-paque(ファルマシア社製)上に重層して500×gで20分間遠心分離した。中間層の末梢血単核細胞(PBM C)をピペットで回収、洗浄した。採取した新鮮分離PBM Cはトリパンブルー染色法にて生細胞数を算出した。

て各実験に供した。

回収した自己血漿は56°C 30分非効化後、800×gで30分間遠心分離し、その上清を非効化自己血漿として使用した（以下自己血漿と略す）。

#### （2）抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材（25cm<sup>2</sup> 細胞培養用フラスコ）に実施例35-（1）と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、AIM-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

#### （3）LAK細胞の誘導および培養

0.5%自己血漿を含むAIM-V（以下0.5%自己血漿AIM-Vと略す）に1×10<sup>6</sup> cells/mLとなるように実施例46-（1）で調製した新鮮分離PBMCを懸濁後、実施例46-（2）で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3mL/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO<sub>2</sub>中37°Cで培養した（培養0日目）。培養開始後1日目には1000U/mLのIL-2を含む0.5%自己血漿AIM-Vを7mL/フラスコずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない85cm<sup>2</sup> 細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグ（オプティサイトバッグまたはX-Foldバッグ バクスター社製）に移した後、0.5%自己血漿AIM-Vを20mL/バッグずつ添加し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/ AIM-Vを30mL/バッグずつ添加し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釀した後、何も固定化していない85cm<sup>2</sup> 細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグ（オプティサイトバッグまたはX-Foldバッグ）に移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mLとなるようIL-2

を添加した。培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表 4 6 に示す。

表 4 6

血漿濃度・培地・細胞培養 用CO <sub>2</sub> ガス透過性バッグ	P B M C ドナー	培養日数	フィプロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
0.5%自己血漿A I M V ・オプティサイトバッグ	A	15 日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 2 2
0.5%自己血漿A I M V ・オプティサイトバッグ	A	15 日間	CH-296	× 2 5 9
0.5%自己血漿A I M V ・X-Foldバッグ	A	15 日間	CH-296	× 3 6 0
0.5%自己血漿A I M V ・オプティサイトバッグ	B	15 日間	対照 (F N f r 非固定化)	× 3 4
0.5%自己血漿A I M V ・オプティサイトバッグ	B	15 日間	CH-296	× 4 3 2
0.5%自己血漿A I M V ・X-Foldバッグ	B	15 日間	CH-296	× 3 6 0

表 4 6 に示されるように、低濃度 (0. 5%) の自己血漿を含んだ培地 (A I M V) を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグの種類によらずLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例 4 7 新鮮分離P B M C および自己血漿含有培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD 8陽性細胞比率の測定 (0. 5%自己血漿を含むA I M V培地  
・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせた

培養)

(1) LAK細胞の誘導および培養

実施例46-(3)と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。培養開始15日目に実施例4-(2)と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表47に示す。

表47

血漿濃度・培地・細胞培養用CO <sub>2</sub> ガス透過性バッグ	P B M C ドナー	培養日数	フィブロネクチンフラグメント	CD8細胞陽性比率(%)
0.5%自己血漿A I M V ・オプティサイトバッグ	B	15日間	対照(FNfr非固定化)	45.0
0.5%自己血漿A I M V ・オプティサイトバッグ	B	15日間	CH-296	89.8
0.5%自己血漿A I M V ・X-Fold/バッグ	B	15日間	CH-296	90.0

表47に示されるように、低濃度(0.5%)の自己血漿を含んだ培地(AIM V)を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグの種類によらずLAK細胞集団中のCD8細胞陽性比率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例48 新鮮分離P B M Cおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定(0.5%自己血漿を含むA I M V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材(25cm<sup>2</sup>細胞培養用フラスコ)に実施例3

5-(1) と同様に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNfrを含むPBSを除去後、各フラスコをPBSで2回、AIM-V培地で1回洗浄し各実験に供した。

#### (2) LAK細胞の誘導および培養

0.5%自己血漿を含むAIM-V(以下0.5%自己血漿AIM-Vと略す)に $1 \times 10^6$  cells/mLとなるように実施例46-(1)と同様の方法で調製した新鮮分離PBMCを懸濁後、実施例48-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化フラスコ、または抗ヒトCD3抗体およびFNfr固定化フラスコに3mL/フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度1000U/mLとなるようIL-2を添加した。これらのフラスコを5%CO<sub>2</sub>中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始後1日目には1000U/mLのIL-2を含む0.5%自己血漿AIM-Vを7mL/フラスコずつ添加した。培養開始後4日目には培養液を何も固定化していない85cm<sup>2</sup>細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグ(オプティサイトバッグ)に移した後、0.5%自己血漿AIM-Vを20mL/バッグずつ添加し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/ AIM-Vを30mL/バッグずつ添加し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始後8日目には培養液の一部を適宜希釀した後、何も固定化していない85cm<sup>2</sup>細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグ(オプティサイトバッグ)に移し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始11、13日目には終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。

また、同様に4日目まで培養した培養液を何も固定化していない180cm<sup>2</sup>細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグに一部(10mL中7mL)移した後、0.5%自己血漿AIM-Vを58mL/バッグずつ添加し、終濃度500U/mLとなるようIL-2を添加した。培養開始6日目には0.5%自己血漿/ AIM-Vを65mL/バッグずつ添加し、終濃度500U/mLとなるようIL-2

を添加した。培養開始後 8 日目には培養液の一部を適宜希釈した後、何も固定化していない  $180 \text{ cm}^2$  細胞培養用  $\text{CO}_2$  ガス透過性バッグ（オプティサイトバッグ）に移し、終濃度  $500 \text{ U/mL}$  となるよう IL-2 を添加した。培養開始 11、13 日目には終濃度  $500 \text{ U/mL}$  となるよう IL-2 を添加した。この際培養開始 11 日目に 0.5% 自己血漿/AIM-V を  $130 \text{ mL}$  添加する系も設定した。培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表 4-8 に示す。

表 4-8

血漿濃度・培地・細胞 培養用 $\text{CO}_2$ ガス透過性 バッグ	バッグ 培養面積	11 日目 培地添加	培養 日数	フィブロネクチンフ ラグメント	拡大 培養率 (倍率)
0.5% 自己血漿 AIM V・オプティサイトバッグ	$85 \text{ cm}^2$	なし	15 日間	対照 (FNfr 非固定化)	$\times 22$
0.5% 自己血漿 AIM V・オプティサイトバッグ	$85 \text{ cm}^2$	なし	15 日間	CH-296	$\times 259$
0.5% 自己血漿 AIM V・オプティサイトバッグ	$180 \text{ cm}^2$	なし	15 日間	CH-296	$\times 473$
0.5% 自己血漿 AIM V・オプティサイトバッグ	$180 \text{ cm}^2$	あり	15 日間	CH-296	$\times 911$

表 4-8 に示されるように、低濃度（0.5%）の自己血漿を含んだ培地（AIM-V）を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用  $\text{CO}_2$  ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞誘導初期に各フィブロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用  $\text{CO}_2$  ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらず LAK 細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィブロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用  $\text{CO}_2$  ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例 4 9 新鮮分離 P B M C および自己血漿含有培地を用いた L A K 細胞集団中における CD 8 陽性細胞比率の測定 (0. 5 % 自己血漿を含む A I M V 培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 C O<sub>2</sub> ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) L A K 細胞の誘導および培養

実施例 4 8 - (2) と同様の方法で L A K 細胞を誘導・培養した。培養開始 15 日目に実施例 4 - (2) と同様の方法で CD 8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 4 9 に示す。

表 4 9

血漿濃度・培地・細胞 培養用 C O <sub>2</sub> ガス透過性 バッグ	バッグ 培養面積	11 日 目培地 添加	培養 日数	フィプロネクチン フラグメント	CD8 細胞 含有比率 (%)
0.5 % 自己血漿 A I M V・オプティサイトバッグ	8.5 cm <sup>2</sup>	なし	15 日間	対照 (F N f r 非固定化)	37.4
0.5 % 自己血漿 A I M V・オプティサイトバッグ	8.5 cm <sup>2</sup>	なし	15 日間	CH-296	70.0
0.5 % 自己血漿 A I M V・オプティサイトバッグ	18.0 cm <sup>2</sup>	なし	15 日間	CH-296	56.2
0.5 % 自己血漿 A I M V・オプティサイトバッグ	18.0 cm <sup>2</sup>	あり	15 日間	CH-296	58.4

表 4 9 に示されるように、低濃度 (0. 5 %) の自己血漿を含んだ培地 (A I M V) を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 C O<sub>2</sub> ガス透過性バッグを組み合わせた L A K 細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用 C O<sub>2</sub> ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらず L A K 細胞集団中の CD 8 細胞陽性比率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 C O<sub>2</sub> ガス透過性バッグを組み合わせた L A K 細胞培養時に好適に使用されることが明らかと

なった。

実施例 5 0 新鮮分離 P B M C および自己血漿含有培地を用いた L A K 細胞培養  
培養系における細胞傷害活性の測定 (0. 5 %自己血漿を含む A I M V 培地・  
細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 C O<sub>2</sub> ガス透過性バッグを組み合わせた培  
養)

(1) L A K 細胞の誘導および培養

実施例 4 6 - (3) と同様の方法で L A K 細胞を誘導・培養した。

(2) 培養した L A K 細胞の細胞傷害活性の測定

実施例 2 5 - (2) と同様の方法で培養後 1 5 日目の L A K の細胞傷害活性を  
測定した。結果を表 5 0 に示す。

表 5 0

血漿濃度・培地・細胞培養用 C O <sub>2</sub> ガス透過性バッグ	培養日数	フィプロネクチ ンフラグメント	E/T	細胞傷害 活性 (%)	細胞傷害 活性 (%)
0.5 %自己血漿 A I M V · オプティサイトバッグ	1 5 日間	対照 (F N f r 非固定化)	9 0 3 0 1 0	5 0. 9 3 2. 9 1 6. 9	5 6. 2 4 9. 6 3 5. 7
0.5 %自己血漿 A I M V · オプティサイトバッグ	1 5 日間	CH - 2 9 6	9 0 3 0 1 0	7 5. 9 4 8. 3 1 9. 6	6 2. 3 5 3. 7 4 0. 2

表 5 0 に示されるように、低濃度 (0. 5 %) の自己血漿を含んだ培地 (A I M V) を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 C O<sub>2</sub> ガス透過性バッグを組み合わせた L A K 細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、対照群に比較して L A K 細胞の細胞傷害活性が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 C O<sub>2</sub> ガス透過性バッグを組み合わせた L A K 細胞培養時に好適に使用されることが明ら

かとなった。

実施例 5 1 新鮮分離 P B M C および自己血漿含有培地を用いた L A K 細胞培養系における拡大培養率の測定 (0. 5 %自己血漿を含む A I M V 培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用 C O<sub>2</sub> ガス透過性バッグを組み合わせた培養)

(1) 抗ヒト C D 3 抗体および F N フラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材 (2 5 c m<sup>2</sup> 細胞培養用フラスコ) に実施例 3 5 - (1) と同様に抗ヒト C D 3 抗体および F N フラグメントを固定化した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・ F N f r を含む P B S を除去後、各フラスコを P B S で 2 回、 A I M V 培地で 1 回洗浄し各実験に供した。

(2) L A K 細胞の誘導および培養

0. 5 %自己血漿を含む A I M V (以下 0. 5 %自己血漿 A I M V と略す) に 5 × 1 0<sup>5</sup> c e l l s / m L となるように (ただし、生細胞数の計測はチュルク液 (関東化学社製) で実施した。) 実施例 4 6 - (1) と同様の方法で調製した新鮮分離 P B M C を懸濁後、実施例 5 1 - (1) で調製した抗ヒト C D 3 抗体固定化フラスコ、または抗ヒト C D 3 抗体および F N f r 固定化フラスコに 3 m L / フラスコずつ細胞懸濁液を入れ、終濃度 1 0 0 0 U / m L となるように I L - 2 を添加した。これらのフラスコを 5 % C O<sub>2</sub> 中 3 7 °C で培養した (培養 0 日目)。培養開始後 1 日目には 1 0 0 0 U / m L の I L - 2 を含む 0. 5 %自己血漿 A I M V を 7 m L / フラスコずつ添加した。培養開始後 4 日目には培養液を何も固定化していない 1 8 0 c m<sup>2</sup> 細胞培養用 C O<sub>2</sub> ガス透過性バッグに一部 (1 0 m L 中 7 m L) 移した後、0. 5 %自己血漿 A I M V を 5 8 m L / バッグずつ添加し、終濃度 5 0 0 U / m L となるよう I L - 2 を添加した。培養開始 6 日目には 0. 5 %自己血漿 / A I M V を 6 5 m L / バッグずつ添加し、終濃度 5 0 0 U / m L となるよう I L - 2 を添加した。培養開始後 8 日目には培養液の一部を適宜希釀した後、何も固定化していない 1 8 0 c m<sup>2</sup> 細胞培養用 C O<sub>2</sub>

ガス透過性バッグ（オプティサイトバッグ）に移し、終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。培養開始 11、13 日目には終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。この際培養開始 11 日目に自己血漿を含まない AIM-V または 0.5% 自己血漿 / AIM-V を 130 mL 添加する系も設定した。培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。結果を表 5-1 に示す。

表 5-1

血漿濃度・培地・細胞培養用 $\text{CO}_2$ ガス 透過性バッグ	PBMC	11 日 目培地 添加	11 日目添加培地	フィプロネクチン フラグメント	拡大培養率 (倍率)
0.5% 自己血漿 A IM-V・オプティサイトバッグ	C	なし	なし	対照 (FNfr 非固定化)	× 570
		なし	なし	CH-296	× 1034
		あり	0.5% 自己血漿 AIM-V	CH-296	× 1857
		あり	0% 自己血漿 AIM-V	CH-296	× 1882
0.5% 自己血漿 A IM-V・オプティサイトバッグ	D	なし	なし	対照 (FNfr 非固定化)	× 947
		なし	なし	CH-296	× 1213
		あり	0.5% 自己血漿 AIM-V	CH-296	× 1647
		あり	0% 自己血漿 AIM-V	CH-296	× 1832
0.5% 自己血漿 A IM-V・オプティサイトバッグ	E	なし	なし	対照 (FNfr 非固定化)	× 743
		なし	なし	CH-296	× 931
		あり	0.5% 自己血漿 AIM-V	CH-296	× 1960
		あり	0% 自己血漿 AIM-V	CH-296	× 1747

表 5-1 に示されるように、低濃度 (0.5%) の自己血漿を含んだ培地 (AIM-V) を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用  $\text{CO}_2$  ガス透過性バッグを組み合わせた LAK 細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定

化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらずLAK細胞の拡大培養率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

実施例52 新鮮分離PBM Cおよび自己血漿含有培地を用いたLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞比率測定（0.5%自己血漿を含むAIM V培地・細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせた培養）

（1）LAK細胞の誘導および培養

実施例51-（2）と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。培養開始15日目に実施例4-（2）と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表52に示す。

表 5 2

血漿濃度・培地・ 細胞培養用CO <sub>2</sub> ガス 透過性バッグ	P B M C ドナー	1 1 日 目培地 添加	1 1 日目添加 培地	フィプロネクチン フラグメント	CD8陽性細 胞率 (%)
0.5%自己血漿A I M V・オプティ サイトバッグ	C	なし	なし	対照 (F N f r 非固定化)	5 9. 1
		なし	なし	CH-296	8 0. 8
		あり	0.5%自己血漿 A I M V	CH-296	8 3. 3
		あり	0%自己血漿 A I M V	CH-296	8 3. 6
0.5%自己血漿A I M V・オプティ サイトバッグ	D	なし	なし	対照 (F N f r 非固定化)	7 7. 2
		なし	なし	CH-296	8 3. 4
		あり	0.5%自己血漿 A I M V	CH-296	8 4. 0
		あり	0%自己血漿 A I M V	CH-296	8 5. 9
0.5%自己血漿A I M V・オプティ サイトバッグ	E	なし	なし	対照 (F N f r 非固定化)	7 2. 6
		なし	なし	CH-296	8 4. 6
		あり	0.5%自己血漿 A I M V	CH-296	8 6. 8
		あり	0%自己血漿 A I M V	CH-296	8 9. 4

表 5 2 に示されるように、低濃度 (0. 5%) の自己血漿を含んだ培地 (A I M V) を用いて、細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞誘導初期に各フィプロネクチンフラグメントを固定化した細胞培養用フラスコを使用した群においては、細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグの培養面積・培養方法・最終培地量によらずLAK細胞集団中のCD8陽性細胞比率が高い。このことから各フィプロネクチンフラグメントは低濃度の血漿を含んだ培地を用いての細胞培養用フラスコおよび細胞培養用CO<sub>2</sub>ガス透過性バッグを組み合わせたLAK細胞培養時に好適に使用されることが明らかと

なった。

**実施例 5 3 低血清培地 (A I M V) を用いた L A K 細胞培養系における I L - 2 レセプター (I L - 2 R) 発現の誘導**

(1) L A K 細胞の誘導および培養

実施例 1 - (3) と同様の方法で L A K 細胞を誘導・培養した。この際使用する培地を 1 % h u m a n A B 血清を含む A I M V 培地に変更した。

(2) L A K 細胞における I L - 2 R 発現率の測定

実施例 3 - (2) と同様の方法で、 I L - 2 R 発現陽性細胞含有率を測定した。結果を表 5 3 に示す。かかる表では I L - 2 R 発現陽性細胞含有率 (%) を I L - 2 R 発現率 (%) と表示する。

表 5 3

血清濃度・培地	フィブロネクチン フラグメント	I L - 2 R 発現率 (%)
1 % A I M V	対照 (F N f r 非固定化)	23.5
1 % A I M V	CH - 296	27.2

表 5 3 に示されるように、低濃度の血清を含んだ A I M V 培地を用いての L A K 細胞誘導初期各フィブロネクチンフラグメントを固定化した培養器材を使用した群においては、培養中の L A K 細胞表面上における I L - 2 R 発現率を高く誘導することができた。すなわち低濃度の血清を含んだ培地を用いて L A K 細胞を誘導する際にフィブロネクチンフラグメントを共存させることにより、 I L - 2 R 発現率を高くしながら L A K 細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

**実施例 5 4 レトロネクチン変異体タンパク質の発現 (CH - 296Na)**

(1) CH - 296Na 発現ベクターの構築

配列番号27、28の合成DNAプライマー（それぞれPrimer CH-296Na1およびPrimer CH-296Na2）を用い、CH-296発現ベクターであるpCH102を鋳型にPCR反応を行い、得られたDNA断片をNdeIおよびHindIIIで制限酵素処理した。一方、国際公開第99/27117号パンフレットの実施例5記載のpCol1d04から同パンフレットの実施例4の方法に従い調製した翻訳開始コドンのところにNdeIサイトを有するpCol1d14ND2ベクターを作製した。pCol1d14ND2ベクターのNdeI-HindIII制限酵素部位に前記DNA断片を挿入することで、ベクターpCol1d14ND2-CH296を得た。次に、フィブロネクチンの細胞結合ドメインの一部からC末端までをコードするcDNAを有するpLF2435ベクターを鋳型に、配列番号28、29の合成DNAプライマー（それぞれPrimer CH-296Na2およびPrimer CH-296Na3）を用いてPCR反応を行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで制限酵素処理した。こうして得られたDNA断片をpCol1d14ND2-CH296をBamHIおよびHindIIIで制限酵素処理したものとライゲーションすることによりCH-296Na発現用ベクターを作成した。

## （2）CH-296Naの発現、精製

上記実施例54-（1）で調製したpCol1d14-CH296Naを用いて大腸菌BL21を形質転換し、その形質転換体を1.5%（w/v）濃度の寒天を含むLB培地（アンピシリン50μg/mL含む）上で生育させた。生育したコロニーを30mLのLB液体培地（アンピシリン50μg/mL含む）に植菌し、37℃で一晩培養した。全量を3Lの同LB培地に植菌し、37℃で対数増殖期まで培養した。なお、この培養の際には、5L容ミニジャーファーメンター（Biott社製）を使用し、150rpm、Air=1.0L/minの条件で行なった。前記培養後、15℃まで冷却した後、IPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、そのまま15℃で24時間培養して発現誘導させた。その

後菌体を遠心分離により集め、菌体容量の4倍量の細胞破碎溶液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 mM NaCl] に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離 (11,000 rpm 20分) により上清の抽出液と沈殿とに分離した。これを2Lのbuffer A [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl] で透析を行い、その約40mLを用いてさらにイオン交換クロマトによる精製を以下のように行なった。

すなわち、樹脂容積にして100mL分のSP-Sepharose (アマシャムファルマシア社製) をbuffer Aで飽和させたカラム (Φ4cm 20cm) を準備し、これに透析後のサンプルをアプライした。300mLのbuffer Aでカラムを洗浄した後、buffer B [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl]、buffer C [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl]、buffer D [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl] の各200mLを用いて順にカラムからの溶出を行い、約100mLずつ分取し画分1～6を得た。分取した分画を、10% SDS-PAGEに供じた結果、分子量約71kDaの目的タンパク質を多く含むことが分かった画分2、3 (約200mL) を回収し、2Lのbuffer Aで透析を行なった。

次に、樹脂容積にして50mL分のQ-Sepharose (アマシャムファルマシア社製) をbuffer Aで飽和させたカラム (Φ3cm 16cm) を準備し、これに透析後のサンプルをアプライした。カラムを200mLのbuffer Aで洗浄した後、buffer E [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 140 mM NaCl]、buffer B、buffer Cの各150mLを用いて順にカラムからの溶出を行い、約100mLずつ分取し画分1～5を得た。10% SDS-PAGEに供じた結果、目的タンパク質のみを多く含むことが分かった画分1 約100mLを回収し、2Lのbuffer F [50m

M 炭酸ナトリウム緩衝液 pH 9.5] で透析を行なった。

その後、セントリコン-10（ミリポア社製）で約4倍の25mLまで濃縮を行い、10% SDS-PAGEで確認したところ、分子量約71kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドで検出され、これをCH-296Naとした。その後、MicroBCAキット（ピアース社製）を使用して、タンパク質濃度を測定したところ、3.8mg/mLであった。

実施例55 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（血清濃度5%→1%→0%→0%、5%→1%→0.05%→0.05%、3%→1%→0.05%→0.05%、3%→1%→0.1%→0.05%）

実施例43と同様の観点で30mL採血により得られる血漿濃度を考慮してLAK細胞培養系における血清濃度の影響を確認した。

human AB血清濃度は培養開始時に5%、3%あるいは1%含有する区分を設定し、以降下記表54に示すhuman AB血清濃度を含むAIM-V培地により希釈する群をそれぞれ設定した。なお、下記表54に示すように各継代日に継代濃度を変更した区分もそれぞれ設定した。

表54 血清濃度パターン

		培養開始 0日目	培養開始 4日目	培養開始 7日目	培養開始 10日目
血清濃度パターン 1-1	血清濃度	5%	1%	0%	0%
	継代濃度	-	0.1	0.321	0.873
血清濃度パターン 1-2	血清濃度	5%	1%	0.05%	0.05%
	継代濃度	-	0.2	0.321	0.841
血清濃度パターン 2-1	血清濃度	3%	1%	0.05%	0.05%
	継代濃度	-	0.1	0.321	0.746
血清濃度パターン 2-2	血清濃度	3%	1%	0.1%	0.05%
	継代濃度	-	0.2	0.321	0.643
血清濃度パターン 3-1	血清濃度	1%	1%	0.1%	0.05%
	継代濃度	-	0.1	0.321	0.643
血清濃度パターン 3-2	血清濃度	1%	1%	0.1%	0.05%
	継代濃度	-	0.05	0.417	1.214
血清濃度パターン 3-3	血清濃度	1%	1%	0.1%	継代、培地添加なし
	継代濃度	-	0.05	0.23	

\*細胞継代濃度: ( $\times 10^6$  cells/mL)

\*表中の血清濃度は培養開始0日目は開始時の濃度、以降は希釈に使用した培地に含まれる血清濃度

5%、3%あるいは1%のhumanAB血清を含むAIM-Vに $0.33 \times 10^6$  cells/mLとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例41-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH-296固定化プレートに3mL/ウェルずつまき、終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO<sub>2</sub>中37℃で培養した(培養0日目)。

培養開始後4日目に血清濃度パターン1-1、2-1および3-1で培養する区分は、 $0.1 \times 10^6$  cells/mLとなるように、血清濃度パターン1-2および2-2で培養する区分は、 $0.2 \times 10^6$  cells/mLとなるように、血清濃度パターン3-2および3-3で培養する区分は、 $0.05 \times 10^6$  cells/mLとなるように、1%humanAB血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量6mL)、何も固定化していない12.5cm<sup>2</sup>細胞培養フラス

コに移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 7 日目には血清濃度パターン 1-1 で培養する区分は、0. 321 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるように human AB 血清を含まない AIM-V により希釈し（液量 12.6 mL）、血清濃度パターン 1-2 および 2-1 で培養する区分は、0. 321 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるように 0.05% human AB 血清を含む AIM-V により希釈し（液量 12.6 mL）、また血清濃度パターン 2-2 および 3-1 で培養する区分は 0. 321 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるように、血清濃度パターン 3-2 で培養する区分は 0. 417 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるように、血清濃度パターン 3-3 で培養する区分は 0. 23 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるようにそれぞれ 0. 1% human AB 血清を含む AIM-V によりそれぞれ希釈し（液量 12.6 mL）、各区分は何も固定化していない新しい 25 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 10 日目には血清濃度パターン 1-1 で培養する区分は、0. 873 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるように human AB 血清を含まない AIM-V により希釈し（液量 12.6 mL）、血清濃度パターン 1-2 で培養する区分は 0. 841 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるように、血清濃度パターン 2-1 で培養する区分は 0. 746 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるように、血清濃度パターン 2-2 および 3-1 で培養する区分は 0. 643 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるように、血清濃度パターン 3-2 で培養する区分は 1. 214 × 10<sup>6</sup> cells/mL となるように、0. 05% human AB 血清を含む AIM-V によりそれぞれ希釈し（液量 12.6 mL）、何も固定化していない新しい 25 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコを立てたものに移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は 2 連で行った。その平均の各結果を表 5 5 に示す。

表 5 5

	培養開始 0 日目刺激	拡大培養率 (倍率)
血清濃度パターン 1-1	抗 CD 3	4 6 0
	抗 CD 3 + CH-296	7 0 8
血清濃度パターン 1-2	抗 CD 3	3 5 4
	抗 CD 3 + CH-296	6 1 6
血清濃度パターン 2-1	抗 CD 3	3 3 8
	抗 CD 3 + CH-296	6 3 0
血清濃度パターン 2-2	抗 CD 3	2 8 9
	抗 CD 3 + CH-296	5 1 4
血清濃度パターン 3-1	抗 CD 3	3 1 7
	抗 CD 3 + CH-296	5 5 1
血清濃度パターン 3-2	抗 CD 3	2 4 3
	抗 CD 3 + CH-296	5 8 7
血清濃度パターン 3-3	抗 CD 3	2 5 7
	抗 CD 3 + CH-296	5 6 4

表 5 5 に示されるように、各血清濃度を含んだ AIM-V 培地を用いての LAK 細胞培養において、いずれの血清濃度区分、またいずれの継代濃度区分においても、対照群（抗 CD 3 抗体のみによる刺激）と比較して CH-296 および抗 CD 3 抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、30 mL 採血を想定した血清濃度における LAK 細胞培養において、CH-296 および抗 CD 3 抗体により刺激することで、抗 CD 3 抗体単独で刺激するよりも、明らかに高い拡大培養率で LAK 細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養における細胞は高濃度・高密度であり、CH-296 で刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH-296 の有効性が認められた。

実施例 5 6 低血清培地 (A I M V) を用いた L A K 細胞培養系における拡大培養率の測定 (I L - 2 濃度、 1 0 0 U / mL → 1 5 0 U / mL → 1 5 0 U / mL → 3 0 0 U / mL、 2 0 0 U / mL → 3 0 0 U / mL → 3 0 0 U / mL → 4 0 0 U / mL、 1 0 0 0 U / mL → 5 0 0 U / mL → 5 0 0 U / mL → 5 0 0 U / mL)

L A K 細胞培養系における I L - 2 濃度の影響を確認した。

培養開始時および継代時に添加する I L - 2 濃度を下記表 5 6 - 1 に示すように設定した。

表 5 6 - 1

	培養開始 0 日目	培養開始 4 日目	培養開始 7 日目	培養開始 1 0 日目
I L - 2 濃度パターン 1	1 0 0	1 5 0	1 5 0	3 0 0
I L - 2 濃度パターン 2	2 0 0	3 0 0	3 0 0	4 0 0
I L - 2 濃度パターン 3	1 0 0 0	5 0 0	5 0 0	5 0 0

\* I L - 2 濃度 (U / mL)

3 % の h u m a n A B 血清を含む A I M V に  $0.33 \times 10^6$  c e l l s / mL となるように実施例 1 - (1) で調製した P B M C を懸濁後、実施例 4 1 - (1) で調製した抗ヒト C D 3 抗体固定化プレート、または抗ヒト C D 3 抗体および C H - 2 9 6 固定化プレートに 3 mL / ウエルずつまき、終濃度 1 0 0 U / mL、 2 0 0 U / mL あるいは 1 0 0 0 U / mL となるように I L - 2 を添加した。これらのプレートを 5 % C O<sub>2</sub> 中 3 7 ℃ で培養した (培養 0 日目)。

培養開始後 4 日目に各区分とも、  $0.1 \times 10^6$  c e l l s / mL となるように 1 % h u m a n A B 血清を含む A I M V により希釈し (液量 6 mL) 、何も固定化していない 1 2. 5 c m<sup>2</sup> 細胞培養フラスコにそれぞれ移した。 I L - 2 濃度パターン 1 においては終濃度 1 5 0 U / mL となるように、 I L - 2 濃度パターン 2 においては 3 0 0 U / mL となるように、 I L - 2 濃度パターン 3 においては 5 0 0 U / mL となるようにそれぞれ I L - 2 を添加した。

培養開始 7 日目には各区分とも、 $0.262 \times 10^6$  cells/mL となるように 0.05% human AB 血清を含む AIM-V により希釀し（液量 1.2 mL）、何も固定化していない新しい  $25 \text{ cm}^2$  細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。IL-2 濃度パターン 1 においては終濃度  $150 \text{ U/mL}$  となるように、IL-2 濃度パターン 2 においては  $300 \text{ U/mL}$  となるように、IL-2 濃度パターン 3 においては  $500 \text{ U/mL}$  となるようにそれぞれ IL-2 を添加した。

培養開始 10 日目には各区分とも、 $0.585 \times 10^6$  cells/mL となるように 0.05% human AB 血清を含む AIM-V により希釀し（液量 1.2 mL）、何も固定化していない新しい  $25 \text{ cm}^2$  細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。IL-2 濃度パターン 1 においては終濃度  $300 \text{ U/mL}$  となるように、IL-2 濃度パターン 2 においては  $400 \text{ U/mL}$  となるように、IL-2 濃度パターン 3 においては  $500 \text{ U/mL}$  となるようにそれぞれ IL-2 を添加した。

培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は 2 連で行った。その平均の各結果を表 56-2 に示す。

表 56-2

	培養開始 0 日目刺激	拡大培養率（倍率）
IL-2 濃度パターン 1	抗 CD 3	312
	抗 CD 3 + CH-296	522
IL-2 濃度パターン 2	抗 CD 3	331
	抗 CD 3 + CH-296	730
IL-2 濃度パターン 3	抗 CD 3	146
	抗 CD 3 + CH-296	571

表 56-2 に示されるように、継代時に種々の IL-2 濃度で培養した LAK 細胞培養において、いずれの IL-2 濃度区分においても、対照群（抗 CD 3 抗

体のみによる刺激) と比較して CH-296 および抗 CD 3 抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、IL-2 濃度を変更しても、CH-296 および抗 CD 3 抗体により刺激することで、抗 CD 3 抗体単独で刺激するよりも、明らかに高い拡大培養率で LAK 細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養における細胞は高濃度・高密度であり、また、血清濃度も 30 mL 採血で総培養液量が 10 L であることを想定しており、CH-296 で刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH-296 の有効性が認められた。

**実施例 5 7 低血清培地 (AIM-V) を用いて培養した LAK 細胞集団中における CD 8 陽性細胞含有比率 (IL-2 濃度の検討)**

(1) LAK 細胞の誘導および培養

実施例 5 6 と同様の方法で LAK 細胞を誘導・培養した。

(2) LAK 細胞における CD 8 陽性細胞集団含有比率の測定

実施例 4-(2) と同様の方法で CD 8 陽性細胞の含有率を測定した。結果を表 5 7 に示す。

表 5 7

	培養開始 0 日目刺激	CD 8 陽性細胞含有率 (%)
IL-2 濃度パターン 1	抗 CD 3	6 0
	抗 CD 3 + CH-296	6 5
IL-2 濃度パターン 2	抗 CD 3	6 0
	抗 CD 3 + CH-296	6 2
IL-2 濃度パターン 3	抗 CD 3	5 9
	抗 CD 3 + CH-296	6 7

表 5 7 に示されるように、培養開始時、継代時に IL-2 濃度を変更したいずれの区分においても、対照群 (抗 CD 3 抗体のみによる刺激) と比較して CH-296 および抗 CD 3 抗体により刺激した群において培養中の LAK 細胞中にお

けるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち、IL-2濃度を変更してもCH-296による刺激により、明らかにLAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

#### 実施例58 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（培養開始初期濃度の検討）

30mL採血、最終培養液量約10Lと想定したときのLAK細胞培養系における培養開始時の細胞初期濃度の拡大培養率に及ぼす影響を確認した。

培養開始初期細胞濃度を $0.083 \times 10^6$  cells/mL、 $0.167 \times 10^6$  cells/mLあるいは $0.33 \times 10^6$  cells/mLの各区分を設定した。

##### （1）抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち12穴細胞培養プレートあるいは6穴細胞培養プレート（ファルコン社製）に抗ヒトCD3抗体（終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）を含むPBSを1.9mLあるいは4.8mLずつそれぞれ添加した。この時、FNフラグメント添加群には製造例1に記載のフィブロネクチンフラグメント（CH-296）を終濃度 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。対照として、CH-296を添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4°Cで保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗ヒトCD3抗体・CH-296を含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、RPMI培地で1回洗浄し各実験に供した。

##### （2）LAK細胞の誘導および培養

3%のhumanAB血清を含むAIM-Vに $0.083 \times 10^6$  cells

／mL、0. 167×10<sup>6</sup> cells/mLあるいは0. 33×10<sup>6</sup> cells/1 s/mLとなるように実施例1－(1)で調製したPBMCをそれぞれ懸濁後、0. 083×10<sup>6</sup> cells/1 s/mLあるいは0. 167×10<sup>6</sup> cells/mLで培養開始する区分は実施例58－(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化6穴細胞培養プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH-296固定化6穴細胞培養プレートに7. 5 mL/ウェルずつ、また、0. 33×10<sup>6</sup> cells/1 s/mLで培養開始する区分は実施例58－(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化12穴細胞培養プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH-296固定化12穴細胞培養プレートに3 mL/ウェルずつ、それぞれまき、終濃度1000 U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO<sub>2</sub>中37℃で培養した(培養0日目)。

培養開始後4日目に各区分は、最大0. 1×10<sup>6</sup> cells/mLとなるように1%human AB血清を含むAIM-Vにより希釀し(液量6 mL)、何も固定化していない12. 5 cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度500 U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始7日目には0. 083×10<sup>6</sup> cells/mLで培養開始した区分は、0. 227×10<sup>6</sup> cells/mLとなるように、0. 167×10<sup>6</sup> cells/1 s/mLで培養開始した区分は0. 276×10<sup>6</sup> cells/mLとなるように、また、0. 33×10<sup>6</sup> cells/mLで培養開始した区分は0. 465×10<sup>6</sup> cells/1 s/mLとなるように、それぞれ0. 05%human AB血清を含むAIM-Vにより希釀し(液量最大12. 6 mL)、何も固定化していない新しい25 cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度500 U/mLとなるようIL-2を添加した。

培養開始10日目には0. 083×10<sup>6</sup> cells/mLで培養開始した区分は、0. 58×10<sup>6</sup> cells/mLとなるように、0. 167×10<sup>6</sup> cells/1 s/mLで培養開始した区分は0. 75×10<sup>6</sup> cells/mLとなる

ように、また、 $0.33 \times 10^6$  cells/mLで培養開始した区分は $0.79 \times 10^6$  cells/mLとなるように、それぞれ $0.05\%$ human AB血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量 $12.6\text{ mL}$ )、何も固定化していない新しい $25\text{ cm}^2$ 細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度 $500\text{ U/mL}$ となるようIL-2を添加した。

培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は2連で行った。その平均の各結果を表58に示す。

表58

培養開始細胞初期濃度 ( $\times 10^6$ cells/mL)	培養開始0日目刺激	拡大培養率(倍率)
0.083	抗CD3	70
	抗CD3+CH-296	593
0.167	抗CD3	104
	抗CD3+CH-296	525
0.33	抗CD3	272
	抗CD3+CH-296	565

表58に示されるように、いずれの細胞濃度で培養開始した区分においても、対照群(抗CD3抗体のみによる刺激)と比較してCH-296および抗CD3抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、種々の細胞濃度で培養開始してもCH-296および抗CD3抗体により刺激することで、抗CD3抗体単独で刺激するよりも、明らかに高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養は $30\text{ mL}$ 採血、最終培養液量 $10\text{ L}$ を想定したものであり、CH-296で刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH-296の有効性が認められた。さらに、対照群においては培養開始細胞初期濃度により拡大培養率が大きく変動する様子が確認されたが、CH-296により刺激した区分では、培養開始細胞初期濃度に関わらず、安定した拡大培養率が得られた。

### 実施例 5 9 低血清培地（A I M V）を用いたL A K細胞培養系における拡大培養率の測定（刺激期間）

L A K細胞培養系における抗C D 3抗体単独あるいは抗C D 3抗体およびC H – 2 9 6による培養開始時における刺激の日数が拡大培養率に与える影響について確認した。

刺激日数として2日、3日あるいは4日の各区分を設定した。

3%のh u m a n A B血清を含むA I M Vに各区分とも $0.33 \times 10^6$  c e 1 1 s /m Lとなるように、実施例1 – (1)で調製したP B M Cをそれぞれ懸濁後、実施例4 1 – (1)で調製した抗ヒトC D 3抗体固定化プレート、または抗ヒトC D 3抗体およびC H – 2 9 6固定化プレートに3m L /ウェルずつまき、終濃度1 0 0 0 U /m LとなるようにI L – 2を添加した。これらのプレートを5%C O<sub>2</sub>中3 7°Cで培養した（培養0日目）。

培養開始後2日目あるいは3日にそれぞれ2日刺激の区分、3日刺激の区分を何も固定化していない新しい1 2穴培養プレートにそのまま移した。

培養開始後4日目に各区分とも、 $0.1 \times 10^6$  c e 1 1 s /m Lとなるように1%h u m a n A B血清を含むA I M Vにより希釈し（液量6m L）、何も固定化していない1 2. 5 c m<sup>2</sup>細胞培養フラスコにそれぞれ移した。各区分において終濃度5 0 0 U /m LとなるようにそれぞれI L – 2を添加した。

培養開始7日目には各区分とも、 $0.45 \times 10^6$  c e 1 1 s /m Lとなるように0. 0 5%h u m a n A B血清を含むA I M Vにより希釈し（液量1 2. 6 m L）、何も固定化していない新しい2 5 c m<sup>2</sup>細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度5 0 0 U /m LとなるようにそれぞれI L – 2を添加した。

培養開始1 0日目には各区分とも、 $0.6 \times 10^6$  c e 1 1 s /m Lとなるように0. 0 5%h u m a n A B血清を含むA I M Vにより希釈し（液量1 2.

6 mL）、何も固定化していない新しい25 cm<sup>2</sup>細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度500 U/mLとなるようにそれぞれ1 L-2を添加した。

培養開始15日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は2連で行った。その平均の各結果を表59に示す。

表59

	培養開始0日目刺激	拡大培養率（倍率）
刺激期間2日	抗CD3	266
	抗CD3+CH-296	438
刺激期間3日	抗CD3	424
	抗CD3+CH-296	562
刺激期間4日	抗CD3	257
	抗CD3+CH-296	568

表59に示されるように、培養開始時より種々の刺激期間で培養したLAK細胞培養において、いずれの刺激期間の区分においても、対照群（抗CD3抗体のみによる刺激）と比較してCH-296および抗CD3抗体により刺激した群において高い拡大培養率が得られた。すなわち、刺激期間を変更しても、CH-296および抗CD3抗体により刺激することで、抗CD3抗体単独で刺激するよりも、明らかに高い拡大培養率でLAK細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養における細胞は高濃度・高密度であり、また、血清濃度も30 mL採血で総培養液量が10 Lであることを想定しており、CH-296で刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH-296の有効性が認められた。

実施例60 低血清培地（AIM-V）を用いたLAK細胞培養系における拡大培養率の測定（CH-296Na）

FNフラグメントしてCH-296Naを用いたときのLAK細胞培養系における拡大培養率を測定した。

CH-296Naは細胞培養プレートに固定化する区分とそのまま細胞培養液中に添加する区分を設定した。

#### (1) 抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメントを固定化した。すなわち12穴細胞培養プレートに抗ヒトCD3抗体（終濃度5 $\mu$ g/mL）を含むPBSを1.9mLずつそれぞれ添加した。この時、FNフラグメント添加群には実施例54に記載のフィプロネクチンフラグメント（CH-296Na）を終濃度28.6 $\mu$ g/mLとなるように添加した。対照として、CH-296Naを添加しない群も設定した。

これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4°Cで保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗ヒトCD3抗体・CH-296Naを含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、RPMI培地で1回洗浄し各実験に供した。

#### (2) LAK細胞の誘導および培養

3%のhumanAB血清を含むAIM-Vに0.33 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mLとなるように実施例1-(1)で調製したPBMCをそれぞれ懸濁後、実施例60-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化細胞培養プレート、または抗ヒトCD3抗体およびCH-296Na固定化細胞培養プレートに3mL/ウェルずつまいだ。また、CH-296Naを細胞培養液中にそのまま添加する区分においては、抗ヒトCD3抗体固定化細胞培養プレートにまいだ細胞に対して、終濃度1 $\mu$ g/mLとなるようにCH-296Naを添加した。それぞれの区分において終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加した。これらのプレートを5%CO<sub>2</sub>中37°Cで培養した（培養0日目）。

培養開始後4日目に、各区分とも0.1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mLとなるよう

に 1 % human AB 血清を含む AIM-V により希釀し (液量 6 mL) 、何も固定化していない 12.5 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコに移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 7 日目には各区分とも  $0.5 \times 10^6$  cells/mL となるように、それぞれ 0.05 % human AB 血清を含む AIM-V により希釀し (液量 12.6 mL) 、何も固定化していない新しい 25 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 10 日目には各区分とも  $0.94 \times 10^6$  cells/mL となるように、それぞれ 0.05 % human AB 血清を含む AIM-V により希釀し (液量 12.6 mL) 、何も固定化していない新しい 25 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は 2 連で行った。その平均の各結果を表 60 に示す。

表 60

培養開始 0 日目刺激	拡大培養率 (倍率)
抗 CD 3	222
抗 CD 3 + CH-296Na 固定化	922
抗 CD 3 + CH-296Na 液添加	651

表 60 に示されるように、対照群 (抗 CD 3 抗体のみによる刺激) と比較して CH-296Na を固定化あるいは溶液で添加したいずれの区分においても高い拡大培養率が得られた。すなわち、CH-296Na および抗 CD 3 抗体により刺激することで、抗 CD 3 抗体単独で刺激するよりも、明らかに高い拡大培養率で LAK 細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養は 30 mL

採血、最終培養液量10Lを想定したものであり、CH-296Naで刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH-296Naの有効性が認められた。

#### 実施例6 1 CH-296ビーズの作成

CH-296を固定化するためのビーズとして、Dyna beads M-450 Epox (Dyna 1社製) を使用した。2.8×10<sup>8</sup>個のDyna beads M-450 Epoxを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で3回洗浄した。洗浄したDyna beads M-450 Epox 2.8×10<sup>8</sup>個を、CH-296 140μgを含むPBS 0.7mLに懸濁し、軽く混合しながら4℃で一晩固定化反応を行った。反応液を除去し、0.1%のヒト血清アルブミン(HSA)を含むPBS 0.7mLで3回置換した後、4℃で保存したものをCH-296ビーズとした。

また、CH-296を含まずにビーズを同様に処理したものを対照ビーズとした。

#### 実施例6 2 CD3/CH-296ビーズの作成

CH-296と抗ヒトCD3抗体とを固定化するためのビーズとして、Dyna beads M-450 Epoxを使用した。4×10<sup>8</sup>個のDyna beads M-450 Epoxを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で3回洗浄した。洗浄したDyna beads M-450 Epox 4×10<sup>8</sup>個を、CH-296 160μg、抗ヒトCD3抗体32μgを含むPBS 1mLに懸濁し、軽く混合しながら4℃で一晩固定化反応を行った。反応液を除去し、0.1%のヒト血清アルブミン(HSA)を含むPBS 1mLで3回置換した後、4℃で保存したものをCD3/CH-296ビーズとした。

実施例 6 3 低血清培地 (A I M V) を用いた L A K 細胞培養系における拡大培養率の測定 (F N f r 固定化ビーズによる刺激)

細胞培養用担体 (ビーズ) に固定化されたフィブロネクチンフラグメント (C H - 2 9 6) を用いての L A K 細胞培養に対する効果を確認した。

抗 C D 3 抗体がビーズに固定化されている C D 3 ビーズと何も固定化されていない対照ビーズで刺激する区分 (C D 3 ビーズ区分) 、 C D 3 ビーズと C H - 2 9 6 がビーズに固定化されている C H - 2 9 6 ビーズにより刺激する区分 (C D 3 ビーズ + C H - 2 9 6 ビーズ区分) 、抗 C D 3 抗体と C H - 2 9 6 がビーズに固定化されている C D 3 / C H - 2 9 6 ビーズにより刺激する区分 (C D 3 / C H - 2 9 6 ビーズ区分) を設定した。

1 % の h u m a n A B 血清を含む A I M V に  $0.33 \times 10^6$  c e l l s / mL となるように実施例 1 - (1) で調製した P B M C を懸濁後、何も固定化していない 1 2 穴培養プレートに 3 mL / ウェルずつまき、 C D 3 ビーズ区分は C D 3 ビーズ (D y n a b e a d s M - 4 5 0 C D 3 (p a n T) 、ベリタス社、 D B 1 1 1 1 3) を  $1 \times 10^6$  個 / ウェル、実施例 6 1 で調製した対照ビーズを  $3.8 \times 10^6$  個 / ウェルとなるように、 C D 3 ビーズ + C H - 2 9 6 ビーズ区分は C D 3 ビーズを  $1 \times 10^6$  個 / ウェル、実施例 6 1 で調製した C H - 2 9 6 ビーズを  $0.76 \times 10^6$  個 / ウェルとなるように、また、 C D 3 / C H - 2 9 6 ビーズ区分は実施例 6 2 で調製した C D 3 / C H - 2 9 6 ビーズを  $2.3 \times 10^6$  個 / ウェルとなるように添加した。各ウェルには終濃度 1 0 0 0 U / mL となるように I L - 2 を添加した。これらのプレートを 5 % C O <sub>2</sub> 中 3 7 °C で培養した (培養 0 日目) 。

培養開始後 4 日目に各区分とも培養液中に含まれる各ビーズをマグネットィックスタンドにより除去したのち、  $0.07 \times 10^6$  c e l l s / mL となるように、 1 % h u m a n A B 血清を含む A I M V により希釈し (液量 6 mL) 、何も固定化していない 1 2. 5 c m <sup>2</sup> 細胞培養フラスコに移した。各区分において終

濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 7 日目には各区分とも  $0.25 \times 10^6$  cells/mL となるよう 1% human AB 血清を含む AIM-V によりそれぞれ希釈し (液量 12.6 mL) 、何も固定化していない新しい  $25 \text{ cm}^2$  細胞培養フラスコを立てたものにそれぞれ移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 10 日目には各区分とも  $0.685 \times 10^6$  cells/mL となるよう、1% human AB 血清を含む AIM-V により希釈し (液量 12.6 mL) 、何も固定化していない新しい  $25 \text{ cm}^2$  細胞培養フラスコを立てたものに移した。各区分において終濃度 500 U/mL となるよう IL-2 を添加した。

培養開始 15 日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較しての拡大培養率として算出した。各実験は 2 連で行った。その平均の各結果を表 6-1 に示す。

表 6-1

	培養開始 0 日目刺激	拡大培養率 (倍率)
CD3 ビーズ	抗 CD3	420
CD3 ビーズ + CH-296 ビーズ	抗 CD3 + CH-296	830
CD3 / CH-296 ビーズ	抗 CD3 + CH-296	748

表 6-1 に示されるように、各ビーズにより刺激した LAK 細胞培養において、CD3 ビーズ区分と比較して CD3 ビーズ + CH-296 ビーズ区分および CD3 / CH-296 ビーズ区分により刺激した区分において高い拡大培養率が得られた。すなわち、細胞培養用担体としてビーズを用いた LAK 細胞培養において、CH-296 および抗 CD3 抗体を固定化したビーズにより刺激することで、抗 CD3 抗体単独のビーズで刺激するよりも、明らかに高い拡大培養率で LAK 細胞を誘導・培養することができた。また、このときの培養における細胞は高濃

度・高密度であり、CH-296ビーズで刺激することにより、このような条件下においても、明らかに高い拡大培養率であり、CH-296の有効性が認められた。

実施例64 低血清培地（AIM-V）を用いて培養したLAK細胞集団中におけるCD8陽性細胞含有比率（FNfr固定化ビーズによる刺激）

（1）LAK細胞の誘導および培養

実施例63と同様の方法でLAK細胞を誘導・培養した。

（2）LAK細胞におけるCD8陽性細胞集団含有比率の測定

実施例4-（2）と同様の方法でCD8陽性細胞の含有率を測定した。結果を表62に示す。

表62

	培養開始0日目刺激	CD8陽性細胞含有率（%）
CD3ビーズ	抗CD3	47
CD3ビーズ+CH-296ビーズ	抗CD3+CH-296	49
CD3/CH-296ビーズ	抗CD3+CH-296	59

表62に示されるように、各ビーズにより刺激したLAK細胞培養において、CD3ビーズ区分と比較してCD3ビーズ+CH-296ビーズ区分およびCD3/CH-296ビーズ区分により刺激した区分において培養中のLAK細胞中におけるCD8陽性細胞含有率を高く誘導することができた。すなわち、細胞培養用担体としてビーズを用いたLAK細胞培養において、CH-296および抗CD3抗体を固定化したビーズにより刺激することで、抗CD3抗体単独のビーズで刺激するよりも、明らかにLAK細胞中のCD8陽性細胞の含有率を高くしながらLAK細胞を誘導・培養することが可能であることが明らかとなった。

配列表フリー テキスト

SEQ ID N0:1 ; Partial region of fibronectin named III-8.  
SEQ ID N0:2 ; Partial region of fibronectin named III-9.  
SEQ ID N0:3 ; Partial region of fibronectin named III-10.  
SEQ ID N0:4 ; Partial region of fibronectin named III-11.  
SEQ ID N0:5 ; Partial region of fibronectin named III-12.  
SEQ ID N0:6 ; Partial region of fibronectin named III-13.  
SEQ ID N0:7 ; Partial region of fibronectin named III-14.  
SEQ ID N0:8 ; Partial region of fibronectin named CS-1.  
SEQ ID N0:9 ; Fibronectin fragment named C-274.  
SEQ ID N0:10 ; Fibronectin fragment named H-271.  
SEQ ID N0:11 ; Fibronectin fragment named H-296.  
SEQ ID N0:12 ; Fibronectin fragment named CH-271.  
SEQ ID N0:13 ; Fibronectin fragment named CH-296.  
SEQ ID N0:14 ; Fibronectin fragment named C-CS1.  
SEQ ID N0:15 ; Fibronectin fragment named CHV-89.  
SEQ ID N0:16 ; Fibronectin fragment named CHV-90.  
SEQ ID N0:17 ; Fibronectin fragment named CHV-92.  
SEQ ID N0:18 ; Fibronectin fragment named CHV-179.  
SEQ ID N0:19 ; Fibronectin fragment named CHV-181.  
SEQ ID N0:20 ; Fibronectin fragment named H-275-Cys.  
SEQ ID N0:21 ; Primer 12S.  
SEQ ID N0:22 ; Primer 14A.  
SEQ ID N0:23 ; Primer Cys-A.  
SEQ ID N0:24 ; Primer Cys-S.  
SEQ ID N0:25 ; Fibronectin fragment named CH-296Na.  
SEQ ID N0:26 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named

CH-296Na.

SEQ ID NO:27 ; Primer CH-296Na1.

SEQ ID NO:28 ; Primer CH-296Na2.

SEQ ID NO:29 ; Primer CH-296Na3.

#### 産業上の利用可能性

本発明の細胞傷害性リンパ球の製造方法によれば、無血清・低血清濃度培地を用いた場合でも、拡大培養率が高く、細胞傷害活性が高く維持され、IL-2Rの発現量が有意に上昇し、CD8陽性細胞の比率が向上した細胞傷害性リンパ球が得られる。当該リンパ球は、例えば、養子免疫療法に好適に使用される。従つて、本発明の方法は、医療分野への多大な貢献が期待される。

## 請求の範囲

1. 培地中における血清および血漿の総含有濃度が 0 容量%以上 5 容量%未満である培地を用いて、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下に細胞傷害性リンパ球の誘導、維持および拡大培養から選択される少なくとも 1 つを行う工程を含むことを特徴とする、細胞傷害性リンパ球の製造方法。
2. 細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に製造されたものと比較して、インターロイキン-2 レセプターを高発現するものである請求項 1 記載の方法。
3. 細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に製造されたものと比較して、CD8 陽性細胞を高比率で含有するものである請求項 1 記載の方法。
4. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下での細胞傷害性リンパ球の製造方法と比較して、拡大培養率が高い方法である請求項 1 記載の方法。
5. 細胞傷害性リンパ球が、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の非存在下に製造されたものと比較して、細胞傷害活性が増強されたもしくは高い細胞傷害活性が維持されたものである請求項 1 ~ 4 いずれか 1 項に記載の方法。
6. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物が固相に固定

化されてなるものである請求項 1～5 いずれか 1 項に記載の方法。

7. 固相が細胞培養用器材または細胞培養用担体である請求項 6 記載の方法。

8. 細胞培養用器材がシャーレ、フラスコまたはバッグであり、細胞培養用担体がピーズ、メンブレンまたはスライドガラスである請求項 7 記載の方法。

9. 細胞傷害性リンパ球がリンフォカイン活性化キラー細胞である請求項 1～8 いずれか 1 項に記載の方法。

10. フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号 1～8 で表されるいずれかのアミノ酸配列を少なくとも 1 つ含んでなるポリペプチド (m) であるか、または前記いずれかのアミノ酸配列において 1 もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列を少なくとも 1 つ含んでなるポリペプチドであって、前記ポリペプチド (m) と同等な機能を有するポリペプチド (n) である請求項 1～9 いずれか 1 項に記載の方法。

11. フィブロネクチンのフラグメントが、細胞接着活性および／またはヘパリン結合活性を有するものである請求項 10 記載の方法。

12. フィブロネクチンのフラグメントが、配列表の配列番号 9～20 および 25 で表されるいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドからなる群より選択される少なくとも 1 つのポリペプチドである請求項 10 記載の方法。

13. 細胞培養用器材中で行なう請求項 1 記載の方法であって、

(a) 培養開始時の細胞数と細胞培養用器材における培養面積との比率が、1 c

$\text{cells/cm}^2 \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$  である、および／または  
(b) 培養開始時の培地中の細胞の濃度が、 $1 \text{ cell/mL} \sim 5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$  である、  
の条件を満たす方法。

14. 細胞培養液を希釈する工程を要しない請求項 13 記載の方法。

15. 細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なくともいずれか 1 つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で行なう請求項 1 記載の方法であって、少なくとも 1 回の、細胞培養液の希釈工程、培地の交換工程もしくは細胞培養用器材の交換工程を包含し、かつ少なくとも 1 回の、細胞培養液の希釈工程直後、培地の交換工程直後もしくは細胞培養用器材の交換工程直後の培養条件が、

(c) 細胞培養液中の細胞の濃度が  $2 \times 10^5 \text{ cells/mL} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/mL}$  である、または

(d) 細胞培養液中の細胞数と細胞培養用器材における培養面積との比率が  $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \sim 1 \times 10^8 \text{ cells/cm}^2$  である、  
の条件を満たす方法。

16. 細胞傷害性リンパ球の誘導、維持及び拡大培養の少なくともいずれか 1 つを、フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物の存在下、培地を含む細胞培養用器材中で行なう請求項 1 記載の方法であって、少なくとも 1 回の、細胞培養液の希釈工程、培地の交換工程もしくは細胞培養用器材の交換工程を包含し、かつ少なくとも 1 回の、細胞培養液の希釈工程直後、培地の交換工程直後もしくは細胞培養用器材の交換工程直後の培地中における血清および血漿の総含有濃度が培養開始時と同じか、もしくは培養開始時よりも低減されている

請求項 1 記載の方法。

17. 請求項 1 ~ 16 いずれか 1 項に記載の方法により得られる細胞傷害性リンパ球。

18. 請求項 1 ~ 16 いずれか 1 項に記載の方法により得られる細胞傷害性リンパ球を有効成分として含有する医薬。

19. フィブロネクチン、そのフラグメントまたはそれらの混合物を有効成分として含有し、かつ血清および血漿の総含有濃度が 0 容量 % 以上 5 容量 % 未満であることを特徴とする細胞傷害性リンパ球培養用培地。

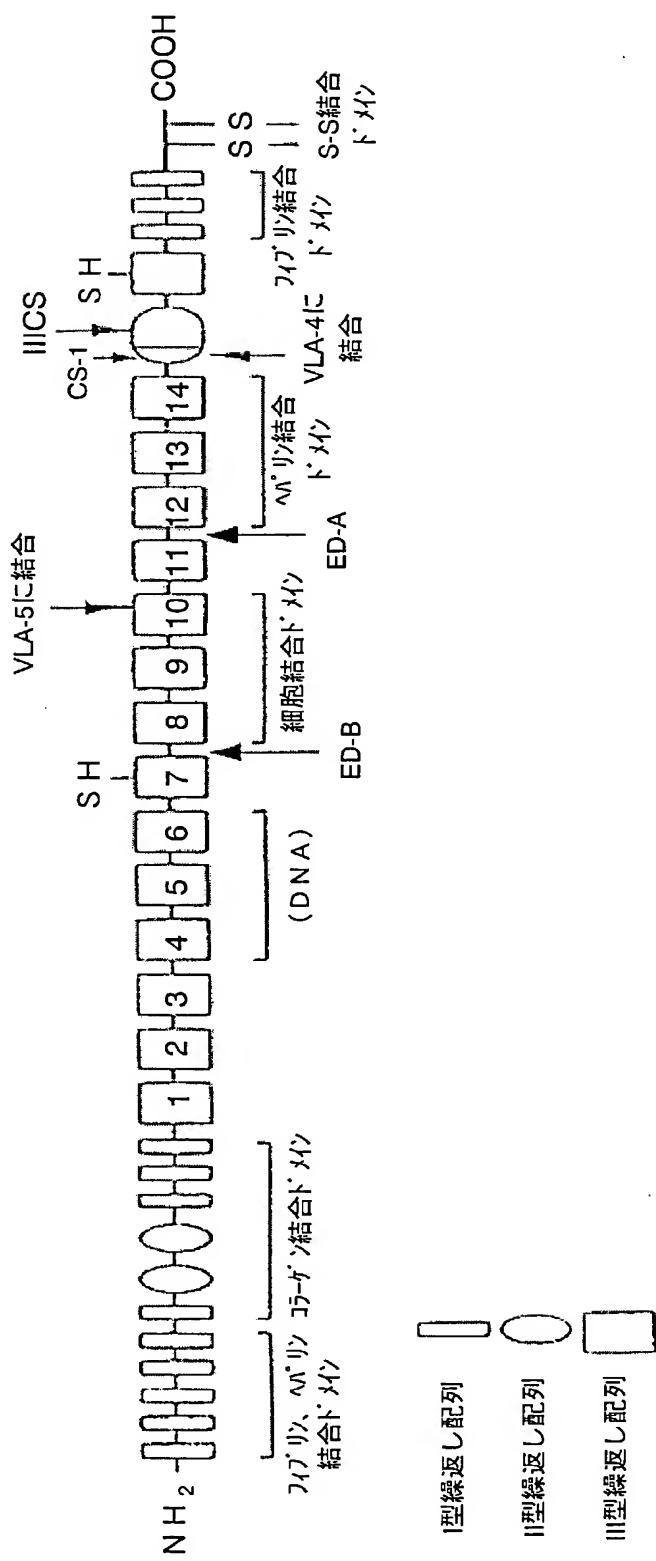
20. 細胞傷害性リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含む請求項 1 ~ 16 いずれか 1 項に記載の方法。

21. 外来遺伝子をレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはシミアンウイルスを用いて導入する請求項 20 記載の方法。

22. 配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列 (x) 、またはアミノ酸配列 (x) において 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、付加もしくは置換したアミノ酸配列 (y) を有するポリペプチドであって、アミノ酸配列 (y) を有するポリペプチドがアミノ酸配列 (x) を有するポリペプチドと同等な機能を有するものである、ポリペプチド。

23. 請求項 22 のポリペプチドをコードする核酸。

24. (1) 配列番号26に記載の塩基配列からなるDNA、(2) 配列番号26に記載の塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換、挿入もしくは付加した塩基配列からなり、かつDNA(1)にコードされるポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドをコードするDNA、または(3) 配列番号26に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつDNA(1)にコードされるポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドをコードするDNAからなる請求項23記載の核酸。



第1図

I型繰返し配列



II型繰返し配列



III型繰返し配列



## SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Process for the preparation of lymphocyte having cytotoxic activity

<130> 04-058-PCTJP

<150> JP 2003-298208

<151> 2003-08-22

<150> JP 2004-699

<151> 2004-01-05

<150> JP 2004-115648

<151> 2004-04-09

<150> JP 2004-222441

<151> 2004-07-29

<160> 29

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-8

<400> 1

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu

20 25 30

Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu

35 40 45

Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu

50 55 60

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln

65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr

80 85

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-9

<400> 2

Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala  
1 5 10 15  
Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr  
20 25 30  
Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro  
35 40 45  
Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr  
50 55 60  
Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu  
65 70 75  
Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr  
80 85 90

<210> 3

<211> 94

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-10

<400> 3

Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro

1	5	10	15
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg			
20	25	30	
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val			
35	40	45	
Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser			
50	55	60	
Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val			
65	70	75	
Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile			
80	85	90	
Asn Tyr Arg Thr			

<210> 4

<211> 84

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-11

<400> 4

1	5	10	15
Gln Met Gln Val Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Lys			
Trp Leu Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr			

20	25	30
Thr Pro Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys Thr Ala Gly		
35	40	45
Pro Asp Gln Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val		
50	55	60
Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Pro Ser Gly Glu Ser		
65	70	75
Gln Pro Leu Val Gln Thr Ala Val Thr		
80		

<210> 5

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-12

<400> 5

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro			
1	5	10	15
Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr			
20	25	30	
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met			
35	40	45	

Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser  
50 55 60  
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu  
65 70 75  
Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr  
80 85 90  
Leu Glu

<210> 6

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-13

<400> 6

Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu  
1 5 10 15  
Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr  
20 25 30  
Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gln Gln Thr Pro Ile  
35 40 45  
Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly  
50 55 60

Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn

65 70 75

Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr

80 85

<210> 7

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> partial region of fibronectin named III-14

<400> 7

Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro

1 5 10 15

Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr

20 25 30

Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu

35 40 45

Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr

50 55 60

Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu

65 70 75

Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr

80

85

90

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; partial region of fibronectin named CS-1

&lt;400&gt; 8

Asp Glu Leu Pro Gin Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His

1

5

10

15

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

20

25

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fibronectin fragment named C-274

<400> 9

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg  
1 5 10 15  
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu  
20 25 30  
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
35 40 45  
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu  
50 55 60  
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
65 70 75  
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
80 85 90  
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
95 100 105  
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
110 115 120  
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
125 130 135  
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
140 145 150  
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
155 160 165  
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
170 175 180  
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu

185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp		

<210> 10

<211> 271

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> fibronectin fragment named H-271

<400> 10

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro

1 5 10 15

Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr

20	25	30
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met		
35	40	45
Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser		
50	55	60
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu		
65	70	75
Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr		
80	85	90
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala		
95	100	105
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr		
110	115	120
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gln Gln Thr		
125	130	135
Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile		
140	145	150
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr		
155	160	165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser		
170	175	180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr		
185	190	195
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile		
200	205	210
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg		

215	220	225
Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile		
230	235	240
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala		
245	250	255
Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys		
260	265	270
Thr		

<210> 11

<211> 296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named H-296

<400> 11

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro			
1	5	10	15
Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr			
20	25	30	
Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met			
35	40	45	
Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser			

50	55	60
Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu		
65	70	75
Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr		
80	85	90
Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala		
95	100	105
Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr		
110	115	120
Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr		
125	130	135
Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile		
140	145	150
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr		
155	160	165
Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser		
170	175	180
Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr		
185	190	195
Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile		
200	205	210
Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg		
215	220	225
Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile		
230	235	240
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala		

245	250	255
Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys		
260	265	270
Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu		
275	280	285
His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr		
290	295	

<210> 12

<211> 549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-271

<400> 12

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg			
1	5	10	15
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu			
20	25	30	
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu			
35	40	45	
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu			
50	55	60	

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
125 130 135

Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
140 145 150

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
155 160 165

Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
170 175 180

Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu  
185 190 195

Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
200 205 210

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
215 220 225

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
230 235 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
245 250 255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg  
260 265 270  
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp  
275 280 285  
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp  
290 295 300  
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr  
305 310 315  
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro  
320 325 330  
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys  
335 340 345  
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg  
350 355 360  
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro  
365 370 375  
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile  
380 385 390  
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp  
395 400 405  
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys  
410 415 420  
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr  
425 430 435  
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser  
440 445 450

Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser  
455 460 465  
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser  
470 475 480  
Trp Gin Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr  
485 490 495  
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg  
500 505 510  
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr  
515 520 525  
Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gin Lys Ser  
530 535 540  
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr  
545

<210> 13

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-296

<400> 13

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1	5	10	15											
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25					30
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
					35				40					45
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
					50				55					60
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
					65				70					75
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
					80				85					90
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
					95				100					105
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
					110				115					120
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp
					125				130					135
Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr
					140				145					150
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Asn	Gly	Arg
					155				160					165
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Gly	Gln	Gln	Ser	Thr	Val	Ser	Asp
					170				175					180
Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
					185				190					195
Leu	Ile	Ser	Trp	Asp	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Tyr	Tyr	Arg

200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro		
365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile		
380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp		

395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys		
410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr		
425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser		
440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser		
455	460	465
Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser		
470	475	480
Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr		
485	490	495
Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg		
500	505	510
Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr		
515	520	525
Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser		
530	535	540
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu		
545	550	555
Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp		
560	565	570
Val Pro Ser Thr		

<210> 14

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named C-CS1

<400> 14

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg  
1 5 10 15  
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu  
20 25 30  
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
35 40 45  
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu  
50 55 60  
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
65 70 75  
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
80 85 90  
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
95 100 105  
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
110 115 120  
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp

125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr		
275	280	285
Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro		
290	295	300
Ser Thr		

<210> 15

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-89

<400> 15

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1								10					15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
				20					25				30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
				35				40				45		
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
				50				55				60		
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
				65				70				75		
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
				80				85				90		
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
				95				100				105		
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
				110				115				120		
Ile	Arg	His	His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp

125	130	135
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr		
140	145	150
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg		
155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg		
275	280	285
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp		
290	295	300
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val		
305	310	315
Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp		

320	325	330
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr		
335	340	345
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro		
350	355	360
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr		
365		

〈210〉 16

<211> 368

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-90

<400> 16

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
65 70 75

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
80 85 90

Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
95 100 105

Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
110 115 120

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
125 130 135

Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
140 145 150

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
155 160 165

Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
170 175 180

Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu  
185 190 195

Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
200 205 210

Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
215 220 225

Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
230 235 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
245 250 255

Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg  
260 265 270  
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn  
275 280 285  
Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp  
290 295 300  
Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu  
305 310 315  
Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro  
320 325 330  
Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu  
335 340 345  
Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu  
350 355 360  
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr  
365

<210> 17

<211> 370

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-92

<400> 17

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg  
1 5 10 15  
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu  
20 25 30  
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
35 40 45  
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu  
50 55 60  
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
65 70 75  
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
80 85 90  
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
95 100 105  
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
110 115 120  
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
125 130 135  
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
140 145 150  
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
155 160 165  
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
170 175 180  
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu

185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gin Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gin Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gin Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gin Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		
350	355	360
Pro Ala Gin Gly Val Val Thr Thr Leu Glu		
365	370	

<210> 18

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-179

<400> 18

Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	Asp	Thr	Met	Arg
1								10					15	
Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	Asn	Phe	Leu
								20					30	
Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	Glu	Leu
								35					45	
Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu
								50					60	
Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln
								65					75	
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp
								80					90	
Ser	Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe
								95					105	
Thr	Val	His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg
								110					120	

Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
125 130 135  
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
140 145 150  
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg  
155 160 165  
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp  
170 175 180  
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu  
185 190 195  
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg  
200 205 210  
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe  
215 220 225  
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys  
230 235 240  
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
245 250 255  
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg  
260 265 270  
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg  
275 280 285  
Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp  
290 295 300  
Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val  
305 310 315

Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp  
320 325 330  
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr  
335 340 345  
Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro  
350 355 360  
Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu  
365 370 375  
Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln  
380 385 390  
Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys  
395 400 405  
Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly  
410 415 420  
Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr  
425 430 435  
Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro  
440 445 450  
Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr  
455

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 459

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CHV-181

<400> 19

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg  
1 5 10 15  
Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu  
20 25 30  
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu  
35 40 45  
Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu  
50 55 60  
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln  
65 70 75  
His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp  
80 85 90  
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe  
95 100 105  
Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg  
110 115 120  
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp  
125 130 135  
Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr  
140 145 150  
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg

155	160	165
Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp		
170	175	180
Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu		
185	190	195
Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg		
200	205	210
Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe		
215	220	225
Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys		
230	235	240
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg		
245	250	255
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg		
260	265	270
Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp		
275	280	285
Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp		
290	295	300
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr		
305	310	315
Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro		
320	325	330
Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys		
335	340	345
Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg		

350	355	360
Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro		
365	370	375
Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile		
380	385	390
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp		
395	400	405
Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys		
410	415	420
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr		
425	430	435
Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser		
440	445	450
Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr		
455		

<210> 20

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named H-275-Cys

<400> 20

Met Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr  
1 5 10 15  
Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn  
20 25 30  
Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys  
35 40 45  
Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser  
50 55 60  
Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser  
65 70 75  
Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly  
80 85 90  
Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg  
95 100 105  
Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr  
110 115 120  
Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala  
125 130 135  
Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg  
140 145 150  
Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile  
155 160 165  
Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val  
170 175 180  
Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe  
185 190 195

Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro  
200 205 210  
Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly  
215 220 225  
Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr  
230 235 240  
Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile  
245 250 255  
Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile  
260 265 270  
Gly Arg Lys Lys Thr Cys  
275

<210> 21

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 12S

<400> 21

aaaccatggc agcttagcgct attccctgcac caactgac 38

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer 14A

<400> 22

aaaggatccc taactagtct ttttccttcc aatcag 36

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-A

<400> 23

aaaagcggcc gctagcgcaa gccatggtct gtttcctgtg 40

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer Cys-S

<400> 24

aaaagcggcc gcactagtgc atagggatcc ggctgagcaa c 41

<210> 25

<211> 658

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fibronectin fragment named CH-296Na

<400> 25

Met Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg

1 5 10 15

Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val

20 25 30

Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile

35 40 45

Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr

50 55 60  
Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr  
65 70 75 80  
Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile  
85 90 95  
Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala  
100 105 110  
Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His  
115 120 125  
Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser  
130 135 140  
Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile  
145 150 155 160  
Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln  
165 170 175  
Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr  
180 185 190  
Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg  
195 200 205  
Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln  
210 215 220  
Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu  
225 230 235 240  
Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg  
245 250 255  
Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr

260 265 270  
Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gin Met Gin Val Thr Asp Val Gin Asp Asn  
275 280 285  
Ser Ile Ser Val Lys Trp Leu Pro Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr  
290 295 300  
Arg Val Thr Thr Pro Lys Asn Gly Pro Gly Pro Thr Lys Thr Lys  
305 310 315 320  
Thr Ala Gly Pro Asp Gin Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gin Pro  
325 330 335  
Thr Val Glu Tyr Val Val Ser Val Tyr Ala Gin Asn Pro Ser Gly Glu  
340 345 350  
Ser Gin Pro Leu Val Gin Thr Ala Val Thr Ala Ile Pro Ala Pro Thr  
355 360 365  
Asp Leu Lys Phe Thr Gin Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gin Trp  
370 375 380  
Thr Pro Pro Asn Val Gin Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro  
385 390 395 400  
Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser  
405 410 415  
Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val  
420 425 430  
Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gin Gly  
435 440 445  
Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val  
450 455 460  
Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr

465                    470                    475                    480  
Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln  
485                    490                    495  
Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile  
500                    505                    510  
Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu  
515                    520                    525  
Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala  
530                    535                    540  
Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser  
545                    550                    555                    560  
Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile  
565                    570                    575  
Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg  
580                    585                    590  
Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly  
595                    600                    605  
Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser  
610                    615                    620  
Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val  
625                    630                    635                    640  
Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro  
645                    650                    655  
Ser Thr

<210> 26

<211> 1989

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> polynucleotide coding CH-296Na

<400> 26

catatgcccc	ctgacacctg	cg attcaccaac	attggtccag	acaccatg	cg tgcaccc	tgg	60							
gctccacccc	catccat	tgta	accaac	ttcctgg	gttactcg	cc	tgtaaaaat	120						
gaggaagat	g	ttgc	agagtt	gtcaattt	cctt	cagaca	atgc	atgtgg	ctta	acaaat	180			
ctcc	tg	cctg	gtacagaata	tgt	atgt	gagt	gtctcc	atgt	tctacga	aca	acatgag	240		
acac	cctt	ta	gaggaagaca	gaaa	acagg	gt	tttcc	caactgg	cat	tgactt	ttct	300		
gatattact	g	ccaa	cttt	tact	gtgc	ac	tggatt	gctc	ctcg	agcc	ac	catcactgg	360	
tacaggat	cc	catcat	cc	cg	gactt	tc	agtgg	gagac	ctcg	aga	ga	tcgggtgccc	420	
cact	ctcg	ga	attccat	ca	cct	cacca	ct	cact	ccag	gc	ac	agagta	480	
atcg	tt	gctc	tta	atgg	cag	agaggaa	gt	cc	tatt	tg	ggcc	aaca	atcaacag	540
tctg	atgt	ttc	cg	agg	ggac	ct	gaa	gtt	gtt	gt	gc	accc	ccacc	600
tggat	gt	tc	ctg	ctgt	tcac	gt	gag	at	gat	gt	ca	act	gtc	660
aatag	cc	cct	tcc	agg	gat	tt	gag	at	gat	ca	tt	acgg	gaga	720
cttaa	ac	ctg	gat	ttg	atta	tac	cat	act	gtat	gtc	t	act	ggcc	780
cccg	ca	gca	gca	gg	ccat	ta	tac	gg	ca	ac	g	acc	cc	840
atg	ca	atg	tg	ta	tt	ac	ca	ac	atg	tg	ca	atg	ttcc	900
cctg	tt	act	tg	gtt	ac	ag	atg	gt	tca	atg	ttc	ttca	act	960
tt	ac	ag	atg	acc	acc	act	cc	aaa	aa	atg	g	acc	agg	acc
tt	ac	ag	at	cc	acc	act	cc	aaa	aa	at	g	acc	aaa	act

aaaactgcag	gtccagatca	aacagaaaatg	actattgaag	gcttgcagcc	cacagtggag	1020
tatgtggta	gtgtctatgc	tcagaatcca	agcggagaga	gtcagcctct	ggttcagact	1080
gcagtaaccg	ctattccitgc	accaactgac	ctgaagttca	ctcaggtcac	acccacaagc	1140
ctgagcgtcc	agtggacacc	acccaatgtt	cagctcactg	gatatcgagt	gcgggtgacc	1200
cccaaggaga	agaccggacc	aatgaaagaa	atcaaccttg	ctcctgacag	ctcatccgtg	1260
gttgtatcag	gacttatggt	ggccacccaaa	tatgaagtga	gigtctatgc	tcttaaggac	1320
actttgacaa	gcagaccagc	tcaggggttt	gtcaccactc	tggagaatgt	cagcccacca	1380
agaagggctc	gtgtgacaga	tgctactgag	accaccatca	ccattagctg	gagaaccaag	1440
actgagacga	tcactggctt	ccaagttgat	gccgttccag	ccaatggcca	gactccaatc	1500
cagagaacca	tcaagccaga	tgtcagaagc	tacaccatta	caggttaca	accaggcact	1560
gactacaaga	tctacctgta	caccitgaat	gacaatgctc	ggagctcccc	tgtggtcac	1620
gacgcctcca	ctgccatgta	tgcaccatcc	aacctgcgtt	tcctggccac	cacacccaaat	1680
tccttgcgtgg	tatcatggca	gccgccacgt	gccaggattt	ccggctacat	catcaagtat	1740
gagaaggcttg	ggtctccctcc	cagagaagtg	gtccctcgcc	cccgccctgg	tgtcacagag	1800
gctactattt	ctggccctgga	accgggaacc	gaatatacaa	tttatgtcat	tgccctgaag	1860
aataatcaga	agagcgagcc	cctgattgga	aggaaaaaga	cagacgagct	tccccaaactg	1920
gtaacccttc	cacacccaa	tcttcatgga	ccagagatct	tggatgttcc	ttccacataaa	1980
tagaagctt						1989

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer CH-296Na1

<400> 27

atcatatgcc cactgacctg cg 22

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer CH-296Na2

<400> 28

ataagcttct attatgtgga agg 23

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer CH-296Na3

<400> 29

accatcactg gctacaggat cc

22

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012238

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/47, C12N5/08, A61K35/26, A61P35/00, A61P37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/47, C12N5/08, A61K35/26, A61P35/00, A61P37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/016511 A1 (Takara Bio Inc.), 27 February, 2003 (27.02.03), & EP 1424387 A1	1-21
X	Proc.Natl.Acad.Sci., USA, Vol.80, No.16, pages 3218 to 3222 (1983)	22-25
A	Eur.J.Immunol., Vol.21, pages 1559 to 1562, (1991)	1-21
A	Cell Immunol., Vol.135, No.1, pages 105 to 117, (1991)	1-21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
01 October, 2004 (01.10.04)Date of mailing of the international search report  
26 October, 2004 (26.10.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2004/012238

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material
    - a sequence listing
    - table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material
    - in written format
    - in computer readable form
  - c. time of filing/furnishing
    - contained in the international application as filed
    - filed together with the international application in computer readable form
    - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2004/012238

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

As reported in the following document 1, a technique of inducing cytotoxic T lymphocytes by using fibronectin and its fragment (for example, VLA-4 binding domain, VLA-5 binding domain, heparin binding domain or the like) had been publicly known before the application of the present case. Thus, this point cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.3.

According to PCT Rule 13.3, unity of inventions should be judged without regard to whether the inventions are claimed in separate claims or as alternatives within a single claim.

Thus, the inventions relating to (continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/012238

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

the represented by SEQ ID NOS:1 to 20 and 25 as claimed are considered not as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept but as 21 invention groups respectively relating to 21 polypeptides differing from each other.

Document 1: WO 03/016511 A1 (Takara Bio Inc.) 27 February, 2003 (27.02.03)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl' C12N15/09, C07K14/47, C12N5/08, A61K35/26, A61P35/00, A61P37/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl' C12N15/09, C07K14/47, C12N5/08, A61K35/26, A61P35/00, A61P37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
SwissProt/PIR/GenSeq, GenBank/EMBL/DDJB/GenSeq,  
WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JSTplus(JOIS), MEDLINE(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 03/016511 A1 (タカラバイオ株式会社) 2003.02.27 & EP 1424387 A1	1-21
X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 80, No. 16, pp. 3218-3222 (1983)	22-24
A	Eur. J. Immunol., Vol. 21, pp. 1559-1562 (1991)	1-21
A	Cell Immunol., Vol. 135, No. 1, pp. 105-117 (1991)	1-21

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 01.10.2004	国際調査報告の発送日 26.10.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 田村明照 4N 8412 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ  配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット  書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期  出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2.  さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 拡足意見：

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

下記文献1に記載されているように、フィブロネクチン及びそのフラグメント（VLA-4結合ドメイン、VLA-5結合ドメイン、ヘパリン結合ドメイン等）を用いて、細胞傷害性Tリンパ球を誘導する技術は出願前公知であるから、この点はPCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。

ここで、PCT規則13.3によると、発明の単一性の判断はこれらの発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に拡一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われるべきものである。

よって、請求の範囲に記載された配列番号1-20及び25で表されるポリペプチドに関する発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいはず、異なった21種のポリペプチドに関する21個の発明からなる発明群であると認める。

文献1: WO 03/016511 A1 (タカラバイオ株式会社) 2003.02.27

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。